



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO**

UFRJ



Biorremediação de solo contaminado com óleo cru proveniente de Angola

Felisberto Lucas Luis Muteca

Orientadores

Profa. Francisca Pessoa de França, D. Sc.

Fernando Jorge Santos de Oliveira, D. Sc.

Rio de Janeiro
2012



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO

UFRJ



Felisberto Lucas Luis Muteca

Dissertação de Mestrado

Orientadores

Profª. Francisca Pessoa de França, D. Sc.

Fernando Jorge Santos de Oliveira, D. Sc.

Março 2012

Ficha Catalográfica

M992b Muteca, Felisberto Lucas Luís.

Biorremediação de solo contaminado com óleo cru proveniente de Angola /
Felisberto Lucas Luís Muteca. – 2012.
xxxi, 76 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) –
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2012.

Orientadores: Prof. Dra. Francisca Pessôa de França. Prof. Dr. Fernando Jorge
Santos de Oliveira

1. Biorremediação. 2. Solo. 3. Óleo cru. 4. Angola. I. França, Francisca Pessôa de.
II. Oliveira, Fernando Jorge Santos de. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química. .

CDD: 660.63673

“Você nunca irá além de onde seus sonhos o levarem”.

John C. Maxwell

Dedicatória

Este trabalho é carinhosamente dedicado aos meus pais Paulo Muteca André e Rebeca Luis, meus exemplos de vida, fé, coragem e perseverança.

Agradecimentos

É imensa a alegria e a satisfação de terminar este processo árduo e intenso de formação. O esforço e a abnegação empreendidos resultaram naquilo que se pode verdadeiramente entender como formação em Mestrado em Tecnologias de Processos Químicos e Bioquímicos. Embora meu nome apareça na capa deste trabalho como autor, aqueles que me conhecem sabem que ele não teria sido escrito sem o apoio direto ou indireto de pessoas cuja colaboração foi fundamental para que este processo de formação fosse um êxito. Assim quero agradecer profundamente:

À aquele que foi, é e sempre será Deus. Pelo dom da vida, pelo dom de sonhar e animo pra lutar, por seu amor incondicional e incansável sustento.

À Professora, Francisca Pessôa de França, pelo apoio, orientação e conforto. Pela paciência e amparo demonstrados diante das inquietações e dificuldades ao longo de todo o processo de formação, sem os quais este processo de formação não teria certamente sido possível.

Ao Dr. Fernando Jorge Santos de Oliveira, pela orientação, pelo apoio sempre presente, colaboração e encorajamento, indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais Paulo Muteca André e Rebeca Luís por me terem aberto as portas da escola, e me terem ensinado que por maiores que sejam os obstáculos apenas com fé, trabalho e persistência podem ser ultrapassados.

Aos meus irmãos Avelina Benguela André (Lina) (in memorial), André Tomé Muteca, Diniz Muteca, Ester Wandy (Mãezinha), Ana Shilepo (Sila) e Paulo Muteca (Jú) pelo estímulo e apoios prestados durante toda a minha formação.

A minha querida noiva Celeste Salomé Ezequiel Correia, pelo amor, carinho e apoio sempre presentes independentemente das circunstâncias.

Aos meus tios Moises Ezequiel Chissonde e Ana Paula Chissonde por serem meu porto seguro, pelo amparo, conforto e encorajamento emocionais ao longo de todo o processo de formação.

Aos manos Bernardo Chinoia Mussango e Ana Feca Mussango por seu encorajamento, orações e suporte.

Ao meu avó Diniz Ezequiel pelo suporte, encorajamento e sabedoria sempre presentes.

Um agradecimento especial é dirigido a Marina Marinho da Fonseca (In Memoriam), Heloisa Helena Marinho da Fonseca, Denise Marinho da Fonseca, Maria Helena Marinho da Fonseca e Sophia Kaczmarek, cujo estímulo, apoio e encorajamentos foram ao longo de todo o processo de formação como um oásis no deserto e, sobretudo fundamentais pra suportar e vencer a saudade.

À Maria Filomena de Souza minha mamãe brasileira, pelo constante carinho, aconchego e amor, sem os quais as estações que caracterizaram este longo e árduo período de formação teriam sido muito mais difíceis de suportar;

A Igreja Metodista em Copacabana, em especial aos pastores Weber Barbosa Chaves e Jonas Falleiro Junior pelo suporte e encorajamento espirituais indispensáveis pra perseverar.

A Sociedade de Mulheres da Igreja Metodista em Copacabana pelo apoio prestado desde o início ao final desta formação e principalmente pelo carinho e abraço fraterno, sem os quais minha caminhada teria sido muito mais fria.

Aos meus irmãos em Cristo em Angola, pelas orações.

Aos meus grandes companheiros de amizade e camaradas do laboratório E-109: Diogo Simas, Flávia Padilha, Gustavo Sant'Anna, Renata Calixto, Carlos Eduardo Felipe, Milton Antério, Teresa Cristina, Jamille Lima e Ulrich Vasconcellos, cuja

simpatia, disponibilidade e apoio foram importantíssimos não apenas para a concretização deste trabalho, mas, também para me sentir em casa embora estivesse longe de minha terra natal.

Ao Governo da província da Huíla-Angola, por permitir que me ausentasse do país pra dar continuidade aos meus estudos.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento da Republica Federativa do Brasil por ter permitido a importação de amostras de solo contaminado com óleo cru, importantíssimas para projeto de pesquisa.

Ao Ministério do Ambiente da Republica de Angola por me terem concedido autorização para exportação de amostras de solo contaminado para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

À Somoil - sociedade de petróleos de Angola no município do Soyo, província do Zaire, por permitir que fizesse a coleta das amostras de solo contaminado com óleo cru, em uma zona de exploração petrolífera sob sua jurisdição.

Ao CNPq finalmente. Sou profundamente grato por todo apoio financeiro sem o qual esta formação não teria sido certamente possível.

Biorremediação de solo contaminado com óleo cru proveniente de Angola

Felisberto Lucas Luís Muteca

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em ciências.

Aprovado por:

Francisca Pessôa de França, D.Sc. EQ-UFRJ
(Orientadora – Presidente da banca)

Fernando Jorge Santos de Oliveira, D.Sc. PETROBRAS
(Orientador)

Marta Antunes P. Langone, D.Sc. UERJ

Walter B. Cravo Junior, D.Sc. PUC/RJ

Eliana F. C. Servulo, DSc. UFRJ

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Março 2012

Resumo de Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências, com ênfase na área de Petróleo e Gás Natural.

BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO CRU PROVENIENTES DE ANGOLA

Felisberto Lucas Luis Muteca
Março 2012

Orientadores: Prof^ª. Francisca Pessoa de França, D.Sc.
Fernando Jorge Santos de Oliveira, D.Sc.

Os fortes impactos positivos à macroeconomia incentivam o desenvolvimento do Setor de petróleo e gás natural em muitos países. Na economia Angolana não é diferente e é com base em tal incentivo que Angola tornou-se um dos maiores produtores de petróleo bruto em 2009 dentre os países de África. Embora as atividades do setor de petróleo e gás sejam macroeconomicamente positivas, são por outro lado grandes geradoras de poluição e contribuintes da degradação ambiental, consumindo grandes quantidades de água e de energia, produzindo grandes quantidades de despejos líquidos, liberando diversos gases nocivos à atmosfera e produzindo resíduos sólidos de difícil tratamento ou disposição final. Assim, é crescente a preocupação com os impactos ambientais decorrentes de atividades que geram volumes consideráveis de resíduos sólidos, dentre os quais se destacam os solos contaminados por hidrocarbonetos. As técnicas utilizadas para a recuperação de tais solos baseiam-se em processos físicos, químicos, térmicos e biológicos. Entre as opções biotecnológicas, o processo de Biorremediação em biorreator de lama destaca-se por ser extremamente útil em degradar compostos altamente recalcitrantes embora, exija gastos adicionais com o transporte do material contaminado, com a construção de equipamentos para uma particular descontaminação e com mão-de-obra adicional e energia. Este trabalho teve como objetivo estudar a alternativa de Biorremediação em escala de bancada de solo contaminado com óleo cru proveniente de Angola. Para tal foram empregadas metodologias de bioestimulação através de umidificação, fertilização e aeração, diluição do solo contaminado e de bioaumento pela inserção de micro-organismos aeróbios provenientes da água do mar. Para avaliar o desempenho do bioprocessos foram monitorados parâmetros relevantes, tais como: pH, umidade, nitrogênio, fósforo, elementos químicos (Sb, As, Ba, Be, Cd, Pb, Cu, Cr, Fe, Mn, Hg, Ni, Ag, Se, V e Zn), hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos(HPA), bactérias aeróbias heterotróficas(BAE), fungos hidrocarbonoclasticos e bactérias anaeróbias heterotróficas (BAN). Os resultados obtidos em 90 dias de tratamento foram promissores considerando o tempo e a concentração inicial dos contaminantes. O emprego do tratamento por biorremediação, usando a técnica de diluição, foi eficiente para remoção de hidrocarbonetos no solo. O solo contaminado, na forma em que foi coletado, também aqui denominado *in natura*, teve remoção de 62% dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e adicionalmente houve remoção de, aproximadamente, 16% na concentração de todos os 16 HPA. Os teores de HTP e HPA presentes no solo após o tratamento estiveram abaixo dos limites de intervenção preconizados pela legislação Brasileira, uma das mais restritivas do mundo.

Summary of Dissertation presented to Curso de Pos-graduação em Tecnologias de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/ UFRJ as part of the requirements for the Degree of Master of Science, with emphasis on Petroleum and Natural Gas.

Bioremediation of soil contaminated with crude oil brought from Angola

Felisberto Lucas Luis Muteca
March 2012

Advisors: Prof^ª. Francisca Pessoa de França, D.Sc.
Fernando Jorge Santos de Oliveira, D.Sc.

The strong positive impacts on the macroeconomy encourage the development of oil and natural gas in many countries. In the Angolan economy is not different and is based on this incentive that Angola has become one of the largest producers of crude oil in 2009 among the countries of Africa. Although the activities of oil and gas are positive macro-economically, on the other hand are large generators of pollution and environmental degradation taxpayers, consuming large amounts of water and energy, producing large quantities of liquid effluents, releasing various gases to the atmosphere and difficult to produce solid waste treatment or disposal. Thus, there is growing concern about the environmental impacts of activities that generate significant volumes of solid waste, among which stand out soils contaminated with hydrocarbons. The techniques used for the recovery of such soils are based on physical, chemical, thermal and biological. Among the options Biotechnology, Bioremediation in the process of sludge bioreactor stands out to be extremely useful to degrade highly recalcitrant compounds though, requires additional expenses to transport the contaminated material, with the construction of a particular equipment for decontamination and hand-additional labor and energy. This work aimed to study the alternative of bioremediation in bench-scale of soil contaminated with crude oil from Angola. For this purpose methods were employed biostimulation through rehydration, fertilization and aeration, dilution of the contaminated soil and bioaugmentation by inserting aerobic micro-organisms from the sea water. To evaluate the performance of the relevant parameters were monitored bioprocess, such as: pH, moisture, nitrogen, phosphorus, chemical elements (Sb, As, Ba, Be, Cd, Pb, Cu, Cr, Fe, Mn, Hg, Ni, Ag, Se, V and Zn), total petroleum hydrocarbons (THP), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), aerobic heterotrophic bacteria (BAE), filamentous fungi and anaerobic heterotrophic bacteria (BAN). The results obtained in 90 days of treatment were promising considering the time and initial concentration of contaminants. The treatment used for bioremediation using the technique bioaugmentation, was effective for removal of hydrocarbons in the soil. The contaminated soil, so that was collected, also referred to here as fresh, had removed 62% of total hydrocarbon oil (HTP) and additionally there was removal of approximately 16% in the concentration of all 16 PHAs. The levels of HTP in the soil after treatment were below the limits of intervention recommended by Brazilian legislation, one of the most restrictive in the world.

ÍNDICE

Capítulo 1. Introdução	1
1.1. Considerações Gerais	1
1.2. Objetivos	5
1.2.1. Objetivo Geral	5
1.2.2. Objetivos específicos	5
Capítulo 2. Revisão bibliográfica	6
2.1. Petróleo: Origem e Composição	6
2.2. Alternativas de Tratamento de Resíduos da Indústria de Petróleo	7
3. Biorremediação	10
4. Tecnologias de Biorremediação in situ	12
4.1. Bioventing ou Bioventilação	12
4.2. Fitorremediação	13
4.3. Atenuação Natural Monitorada	14
5. Tecnologias de Biorremediação ex situ	15
5.1. Landfarming	15
5.2. Biopilhas	15
5.3. Biorreatores	16
5.4. Compostagem	18
6. Fatores que Influenciam a Biorremediação	18
6.1. Fatores Técnicos que afetam a Biorremediação	18
6.1.1. Temperatura	18
6.1.2. Biodisponibilidade	20
6.1.3. Textura e Estrutura do Solo	21
6.1.4. Limitações Metabólicas	21
6.1.5. Oxigênio	22
6.1.6. Aceptores Alternados de Elétrons	23
6.1.7. Nutrientes	24
6.1.8. Toxicidade	24
6.1.9. pH	25
6.1.10. Concentração de Micro-organismos Degradadores de Hidrocarbonetos	26
6.2. Fatores não Técnicos que Afetam a Biorremediação	27
6.2.1. Pesquisa e Fatores Técnicos	27
6.2.2. Recursos Humanos	27
6.2.3. Econômicos e Legais	28
7. Técnicas de Biorremediação de solos contaminados com Hidrocarbonetos de Petróleo	28
Capítulo 3. Materiais e Métodos	31
3.1. Solo	31
3.2. Testes de Biorremediação do solo	31
3.2.1. Experimento com solo contaminado “in natura”	32
3.2.2. Experimento com variação no teor inicial de óleo cru	33
3.2.3. Monitoramento dos testes de Biorremediação	33
3.3. Análises Físicas	34
3.3.1. Umidade	34
3.3.2. Granulometria	35
3.4. Análises Químicas	35

3.4.1. pH	35
3.4.2. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)	36
3.4.3. Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP)	36
3.4.4. Elementos Químicos	37
3.5. Análises Biológicas	37
3.5.1. Bactérias Aeróbias Heterotróficas (BAE)	37
3.5.2. Fungos Totais	38
3.5.3. Bactérias Anaeróbias Heterotróficas (BAN)	39
Capítulo 4. Resultados e Discussão	40
4.1. Caracterização do solo	40
4.2. Biorremediação do solo <i>in natura</i>	46
4.3. Experimentos para biorremediação de misturas de solo contaminado e não contaminado	52
Capítulo 5. Conclusões e Sugestões	59
5.1. Conclusões	59
5.2. Sugestões	60
Capítulo 6. Referências Bibliográficas	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Composição Setorial do PIB em Angola no ano de 2007	2
Figura 2. Petróleo de Angola, Produção e Consumo, 2000-2010	3
Figura 3. Reatores utilizados para realização do experimento com o solo contaminado com óleo (<i>in natura</i>).	32
Figura 4. Recipientes de plástico utilizados para realização dos experimentos variando-se os teores do solo contaminado.	33
Figura 5. Cromatograma obtido do extrato do solo contaminado no início do experimento (zero hora).	44
Figura 6. Cromatograma obtido do extrato do solo <i>in natura</i> no final do experimento de biorremediação	47
Figura 7. Evolução Bactérias Aeróbias Heterotróficas Totais durante a biorremediação do solo contaminado, <i>in natura</i>	48
Figura 8. Evolução Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais durante a biorremediação do solo contaminado, <i>in natura</i>	49
Figura 9. Evolução de Fungos Totais durante a biorremediação do solo contaminado, <i>in natura</i>	49
Figura 10. Aspecto microscópico das células de micro-organismos crescidas durante os experimentos (coloração pelo método de Gram; aumento 1000x)	50
Figura 11. Aspecto macroscópico dos crescimentos dos Fungos crescidos em Gelose Sabouraud, a partir dos experimentos com 60 dias de processo.	51
Figura 12. Valores de pH e biodegradação dos Hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) em 0 e 90 dias	52
Figura 13. Cromatograma obtido do extrato do solo com 90 dias de processo, usando-se 17% de solo contaminado em relação a solo não contaminado.	54
Figura 14. Evolução das concentrações de bactérias aeróbias heterotróficas nos experimentos contendo diferentes teores de solo contaminado	55
Figura 15. Evolução das concentrações de bactérias anaeróbias heterotróficas nos experimentos contendo diferentes teores de solo contaminado	55
Figura 16. Evolução das concentrações de fungos nos experimentos contendo diferentes teores de solo contaminado	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Custo estimado de remediação de solos para diferentes tipos de tratamento	9
Tabela 2. Composição do meio Caldo Nutriente	38
Tabela 3. Composição do meio Sabouraud	38
Tabela 4. Composição da Solução Redutora	39
Tabela 5. Composição do meio Fluido ao Tioglicolato	39
Tabela 6. Caracterização granulométrica do solo coletado	40
Tabela 7. Metais detectados no solo em estudo	41
Tabela 8. Quantidades de Mercúrio e Nitrogênio no solo contaminado	43
Tabela 9. Concentração dos 16 HPA prioritários da USEPA no solo contaminado	46

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

Quando se analisa o processo histórico de evolução da humanidade constata-se que o ser humano foi, e é até hoje, um dos principais agentes de alteração dos ciclos naturais. As conquistas da humanidade ao longo dos séculos, como, por exemplo, a agricultura, domesticação de animais e sua utilização nos processos produtivos e mais recentemente, com a evolução científica e tecnológica a partir do século XIX, principalmente a partir da revolução industrial, introduziram perturbações significativas no equilíbrio natural do planeta, alterando ecossistemas vitais à própria existência humana (DIAMOND, 2006).

Hoje a civilização tal qual como conhecemos, vive em um contexto de expansão demográfica, econômica e social, e em constante crescimento, no qual o petróleo é uma das principais fontes de energia utilizadas no mundo, devido a sua adaptabilidade, e diversos usos: aquecimento, transporte, energia elétrica, insumos para a indústria petroquímica, entre outros. Sendo assim, atualmente é extensa e fundamental a importância do petróleo na sociedade, pois além de ser uma das principais fontes de energia utilizadas, seus derivados são matérias-primas para a manufatura de inúmeros bens de consumo (IWAMOTO & NASU, 2001; MARIANO, 2005; PANDEFF *et al*, 2008).

Os fortes impactos positivos à macroeconomia incentivam o desenvolvimento do Setor de petróleo e gás natural em muitos países. Na economia Angolana não é diferente: de acordo com a Agência Internacional de Energia - EIA, durante a última década, Angola tornou-se um dos maiores produtores de petróleo bruto dentre os países de África, superando a Nigéria em 2009 por ter sofrido ataques na infra-estrutura petrolífera no Delta do Níger (EIA, 2011). Uma publicação mais recente do Ministério

das Finanças da República de Angola (MINFIN) de 2008 reporta que o setor petrolífero, em 2007 foi responsável por 95,4% das exportações e 81% das receitas do Estado, representando 55,8% do Produto Interno Bruto (PIB) do país (Figura 1).

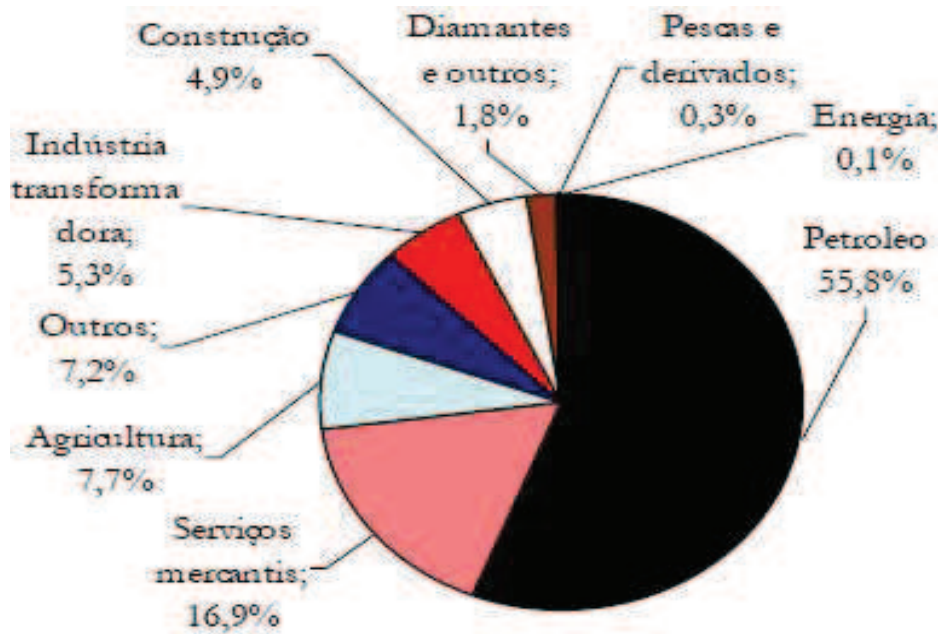


Figura 1. Composição Setorial do PIB em Angola no ano de 2007
Fonte: Ministério das Finanças da Republica de Angola, 2008

Dados estatísticos publicados pelo Fundo Monetário Internacional - FMI em 2010 reportam que os combustíveis continuam sendo uma das principais fontes de exportação do país, representando mais de 95% da receita de exportação e mais de 75% da receita do governo. Uma publicação mais recente da EIA, do inglês, International Energy Annual, apresentada na Figura 2, acrescenta que apenas 5% de toda a produção petrolífera é consumida pelo país. Apesar destes dados serem animadores por indicarem um crescimento significativo na produção de petróleo, se contrapõe ao baixo crescimento do consumo de petróleo do país, perfazendo um total de 5%, que indica o baixo desenvolvimento social e econômico, típico de países em desenvolvimento dos continentes Africano e Sul Americano.

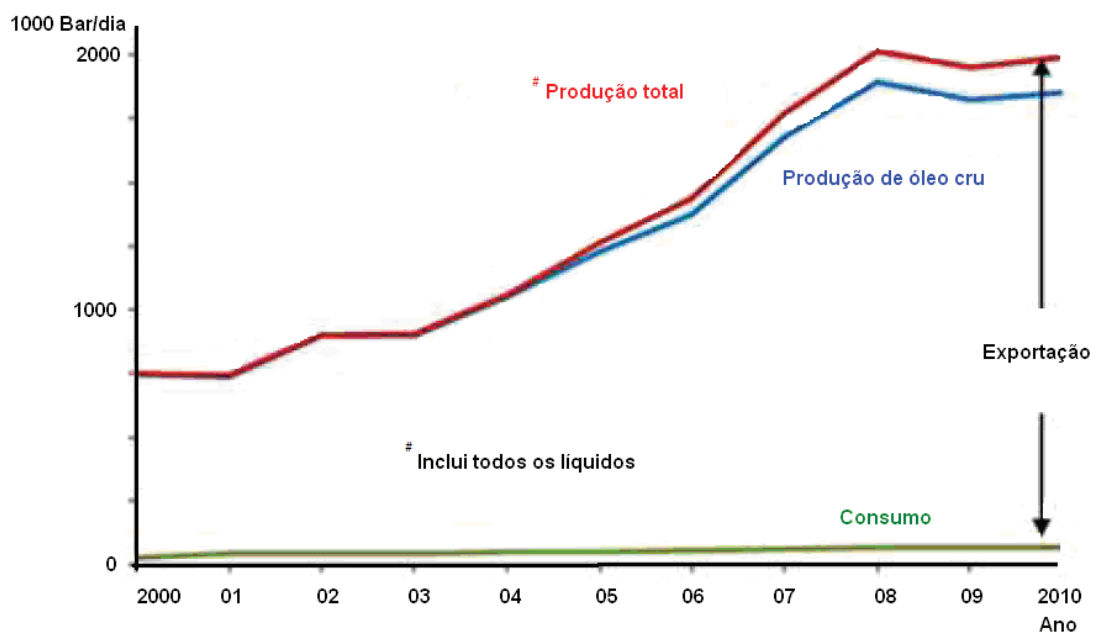


Figura 2. Petróleo de Angola, Produção e Consumo, 2000-2010
Fonte: EIA, 2011

Entretanto, o aumento da demanda de petróleo e seus derivados geraram ao longo de décadas não apenas benefícios à qualidade de vida da população mundial, mas, também prejuízos ao meio ambiente, por isso serem as indústrias de Petróleo reconhecidas como grandes causadoras de impactos ambientais.

Do ponto de vista ambiental, as atividades do Setor de Petróleo e Gás (P & G) são grandes geradoras de poluição, contribuintes da degradação ambiental. Ademais as atividades de P & G consomem grandes quantidades de água e de energia, produzem grandes quantidades de despejos líquidos, liberam diversos gases nocivos na atmosfera, e produzem resíduos sólidos de difícil tratamento ou disposição final. Em decorrência, este setor pode ser considerado, em muitos casos, como um empreendimento de grande impacto ao meio ambiente, pois tem potencial em todos os níveis: ar, água, solo e, conseqüentemente, nos seres vivos que habitam não somente as áreas próximas aos

empreendimentos, mas também em escala global (MOHAMED *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007; PANDEFF *et al.*, 2008).

Desde 2009, vários vazamentos de petróleo têm sido reportados nas províncias de Cabinda e do Zaire (zonas com maior exploração petrolífera em Angola), provocados por rupturas nos dutos de transporte de óleo, por razões ainda não esclarecidas. Tais vazamentos têm causado vários prejuízos econômicos e ambientais. Figueiredo (2009) reporta, por exemplo, que na localidade de Kifuma, município do Soyo, província do Zaire, após ter havido uma ruptura em um duto de transporte de óleo, o rio Nzombo ficou totalmente poluído, impossibilitando o consumo de água do local pelas populações da região e de áreas vizinhas além de ter afetado igualmente uma grande extensão de terra arável.

Em Novembro de 2011, manchas de óleo de origem ainda não determinada poluíram uma vasta extensão da costa marítima do município do Soyo, pondo em risco a biodiversidade da região e, conseqüentemente, prejudicando a sobrevivência da população, que vive essencialmente da atividade pesqueira (FIGUEIREDO, 2011).

A contaminação de solos por compostos orgânicos, como petróleo, pode exigir a utilização de uma combinação de tecnologias físicas, químicas e biológicas para reduzir a contaminação a um nível seguro e aceitável. Embora as primeiras sejam mais efetivas que os métodos biológicos, apresentam uma série de desvantagens dentre as quais o fato de serem caras, requerer alta demanda de energia e são agressivas ao meio ambiente além de exigirem um alto consumo de reagentes químicos. Esta é a razão pela qual o uso de alternativas biotecnológicas capazes de degradar compostos tóxicos, conhecida como Biorremediação, tem se tornado uma ferramenta atrativa e acessível para a limpeza de ambientes poluídos (IWAMOTO, NASU, 2001; MOLINA–BARAHONA *et al.*, 2004; KHAN *et al.*, 2004; D'ANNIBALE *et al.*, 2006; HAMDI *et al.*, 2007).

Nas reportagens examinadas, não são descritas que tecnologias têm sido usadas para a descontaminação dos locais poluídos, assim, estas considerações ambientais e econômicas justificam a elaboração deste trabalho de pesquisa, como uma contribuição e construção alternativa para redução de passivos ambientais, buscando evidenciar como o processo de Biorremediação pode ser utilizado para recuperação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo em Angola.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo Geral

- Estudar alternativas para a biorremediação, em escala de bancada, de solo contaminado com óleo cru provenientes de Angola.

1.2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar alguns aspectos físico-químicos, um solo Angolano que sofreu contaminação com óleo cru.
- Avaliar o efeito da Biorremediação na remoção de hidrocarbonetos alifáticos em solo Angolano, impactado com óleo cru.
- Estudar o potencial da técnica de diluição do solo contaminado e bioestímulo visando uma possível aceleração do processo de remoção de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solo Angolano, impactado com óleo cru.

Capítulo 2. Revisão Bibliográfica

2.1. Petróleo: Origem e Composição

Ao longo da história da Terra, grande quantidade de organismos animais e vegetais foi, lentamente, se depositando no fundo dos lagos e mares. Pela ação do calor e da pressão, provocada pelo seguido empilhamento das camadas geológicas, estes depósitos orgânicos foram transformados, face às reações termoquímicas, em petróleo (óleo cru e gás). A utilização mais intensa do petróleo começou por volta de 1847, quando um comerciante de Pittsburg (Pensilvânia, EUA) começou a engarrafa-lo e vendê-lo como lubrificante. Era proveniente de vazamentos naturais para ser utilizado (CORRÊA, 2003 *apud* RIZZO *et. al.*, 2006). Cinco anos mais tarde (1852), um químico canadense descobriu que a destilação do petróleo produzia um líquido que podia ser utilizado em lâmpadas, o querosene. No entanto, somente em agosto de 1859 foi perfurado o primeiro poço de petróleo em Titusville, Pensilvânia (EUA). A partir daí o petróleo passou a ser utilizado em larga escala, substituindo os combustíveis disponíveis, principalmente o carvão, na indústria, e os óleos de rícino e de baleia, na iluminação.

Com a invenção dos motores a explosão, no final do século XIX, começou-se a empregar as frações, até então, desprezadas do petróleo, e, daí em diante, as suas aplicações se multiplicaram rapidamente. Ao final do século XIX, dez países já extraíam petróleo de seus solos (PETROBRAS, 2005 *apud* RIZZO *et al.*, 2006).

O petróleo bruto possui em sua composição uma cadeia de hidrocarbonetos, cujas frações leves formam os gases e as frações pesadas o óleo cru. Por isto, o petróleo é definido como uma mistura complexa de hidrocarbonetos sólidos, líquidos e gasosos (CORRÊA, 2003 *apud* RIZZO *et al.*, 2006).

2.2. Alternativas de tratamento de resíduos provenientes da indústria de petróleo

Desde a etapa de exploração do petróleo até a comercialização de seus derivados, vários tipos de impactos ambientais podem ser identificados. Estes impactos vão desde as consequências dos estudos sísmicos realizados na etapa de exploração, passando pela geração de resíduos em estado sólido ou líquido e emissões atmosféricas durante o processo de refino, até as consequências eventuais de vazamentos acidentais, ocorridos em terra ou em mar, durante o transporte e o armazenamento dos produtos (PANDEFF *et al.*, 2008). A presença de alguns contaminantes oriundos da indústria do petróleo no solo, água ou ar atmosférico pode causar sérios riscos à saúde humana devido à toxicidade, suas propriedades mutagênicas e carcinogênicas e também devido ao acúmulo na cadeia alimentar (CASTRO *et al.*, 2005).

Por outro lado, é importante referir que vários compostos aromáticos são recalcitrantes sob condições normais devido às fortes ligações moleculares, persistindo e permanecendo no ambiente por longos períodos. Devido a estes fatores, na indústria do petróleo e derivados é crescente a preocupação com os impactos ambientais decorrentes de atividades que geram volumes consideráveis de resíduos sólidos, dentre os quais se destacam os solos contaminados por hidrocarbonetos BUDAVARI (1996), considerando tanto aspectos da via de contato dérmico direto quanto a possibilidade de redução da área cultivável do planeta. Por isso, atualmente, esforços estão sendo envidados no desenvolvimento de novas alternativas de remediação de ambientes contaminados por petróleo.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) representam um grupo grande diversificado de moléculas orgânicas por terem uma ampla gama de propriedades, diferenças quanto a massa molecular, configuração estrutural, solubilidade em água, número de anéis aromáticos, volatilidade, coeficientes de sorção, e etc (HARAYAMA

1997; KANALY *et al.*, 2000; MALISZEWSKA KORDYBACH & SMRECZAK 2000; HARMSEN 2004).

Fontes antropogênicas, como a gasolina e o óleo diesel, as queimas de combustíveis, derrames de petróleo, contribuem à matriz ambiental de HPAs e sua distribuição ubíqua, na persistência ambiental e no efeito potencialmente deletério sobre a saúde humana, resultando num crescente interesse pela comunidade científica em relação ao assunto (JUHASZ & NAIDU, 2000; KANALY *et al.*, 2000; MECKENSTOCK *et al.*, 2004; JOHNSEN *et al.*, 2005).

Foi a partir da década de 60 que as atenções se voltaram para essa realidade e várias técnicas de tratamento passaram a ser adotadas. Tais técnicas baseiam-se em processos físicos (lavagem, extração a vapor), químicos (extração por solvente, processos oxidativos avançados-POAs, desalogenação química, correções superficiais), térmicos (dessorção térmica, incineração) e biológicos (landfarming, biopilhas, biorreatores, etc.). Contudo, quando se pretende utilizar um determinado tipo de tratamento, é importante que se avalie as peculiaridades de cada resíduo e quais os custos envolvidos (URURAHY 1998 *apud* RIZZO *et al.*, 2006; RIZZO *et al.*, 2008).

A Tabela 1 mostra que os processos biológicos, quando comparados aos processos físicos, químicos e térmicos são menos onerosos e menos agressivos ao meio ambiente. Uma justificativa para os menores custos é que, em muitos casos, as alternativas de biotratamento concentram seus esforços em otimizar simplesmente o processo que ocorre de forma natural no solo.

Tabela 1. Custo estimado de remediação de solos para diferentes tipos de tratamento

Tratamento	Custo Estimado de remediação (US\$) tonelada
Remoção para aterros	Acima de 100
Processos Físicos	
Lavagem de solo	25-150
Lavagem físico-química	50-175
Extração a vapor	75
Processos Químicos	
Extração por solvente	50-600
Desalogenação química	175-450
Correções superficiais	10-25
Tratamentos Térmicos	
Dessorção térmica	25-225
Incineração	50-1200
Tratamentos Biológicos	
Landfarming	10-90
Bioventilação	15-75
Biorreator de lama	50-85
Biopilhas	15-35
Biorremediação <i>in-situ</i>	175

Fonte: RIZZO *et al*, 2007 *apud* TRINDADE, 2002

Embora lance mão de mecanismos bioquímicos complexos para a metabolização dos contaminantes, a Biorremediação é o método mais simples de remediação de grandes volumes de solo contaminado, quando comparado aos métodos químicos, térmicos e físicos.

Assim, a implementação correta de micro-organismos ou metabólitos microbianos, minimiza ou elimina produtos tóxicos e isso auxilia a aceitação da Biorremediação como uma tecnologia ambientalmente correta (MAGZU & CARBERRY, 1989; BRADFORD & KRISHNAMOORTHY, 1991; LEVIN &

GEALT, 1993; HICKS & CAPLAN, 1993; CUTRIGHT & LEE, 1994; NORRIS *et al.*, 1994; MILLS, 1995; COOKSON, 1995). Além disso, ao contrário dos processos físicos, químicos e térmicos, os tratamentos biológicos são considerados métodos seguros, eficientes e de menores custos, a serem aplicados para a remediação de solos contaminados por compostos orgânicos. Tais tratamentos se baseiam na capacidade microbiana de degradar esses compostos, denominado biodegradação, que quando aplicado como uma tecnologia de remediação ambiental é chamada de biorremediação (WATANABE, 2001; TRINDADE, 2002; D'ANNIBALE *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007).

3. Biorremediação

A biodegradabilidade do petróleo é dependente da estrutura química e influenciada também pelo estado físico e pela toxicidade dos seus constituintes. O aumento da cadeia do composto confere uma maior complexidade estrutural e, conseqüentemente, uma diminuição do número de micro-organismos capazes de degradá-lo (ATLAS, 1995).

A degradação pode ocorrer através do metabolismo de respiração aeróbia ou anaeróbia. Assim a biodegradação completa ou mineralização envolve a oxidação do composto original para formar o dióxido de carbono e água, e desse modo ocorre a produção de energia utilizada na síntese do material celular (biomassa). Cada passo na rota de degradação é catalisado por uma enzima específica existente no arsenal metabólico da célula degradante (MAIER *et al.*, 2009).

A Biorremediação é uma tecnologia ecologicamente aceitável para a remediação de solos contaminados, a qual utiliza o potencial metabólico dos micro-organismos para a retirada de compostos orgânicos, em especial, hidrocarbonetos de petróleo, que

estejam presentes em ambientes poluídos, resultando na transformação destes compostos em produtos menos tóxicos, ou resultando na sua mineralização (WATANABE, 2001; MOLINA BARAHONA *et al.*, 2004; NAKAGAWA e ANDRÉA, 2006).

O Processo de Biorremediação tem sido definido de várias formas. A Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA), por exemplo, apresenta uma definição mais genérica em relação à biorremediação, definindo-a como sendo um processo de tratamento que utiliza a ocorrência natural de micro-organismos para degradar substâncias toxicamente perigosas transformando-as em outras menos ou não tóxicas. Neste trabalho de pesquisa optou-se por se trabalhar com a definição adotada pelo Escritório de Estudos Geológicos do Departamento do Interior do Governo Americano (USGS), por ser uma definição mais específica cuja definição original pertence à American Heritage Dictionary of the American Language e, define a biorremediação como sendo o uso de agentes biológicos tais como bactérias e plantas, para remover ou neutralizar contaminantes, como poluentes do solo e da água (CHAPELLE 2000 *apud* SANTOS *et al.*, 2007).

A Biorremediação pode ocorrer pela ação de espécies microbianas autóctones, alóctones ou pela sua combinação. Assim sendo, no tratamento de solos contaminados por petróleo, os micro-organismos, sendo as bactérias as mais estudadas, utilizam os hidrocarbonetos, principais constituintes do contaminante, como fonte de carbono e energia alternativa para formação de biomassa. Esse metabolismo envolve a transformação dos hidrocarbonetos em unidades menores e, posteriormente, a incorporação como material celular (biotransformação) ou conversão a gás carbônico (mineralização) resultando na redução da concentração de hidrocarbonetos de petróleo. Por ser uma técnica aplicada a diferentes tipos de ambientes, a biorremediação envolve

diversas áreas de conhecimento humano como a Microbiologia, Engenharia, Ecologia, Geologia e Química (BOOPATHY, 2000; MARTINS *et al.*, 2003).

Mesmo considerando as vantagens anteriormente citadas, são vários os fatores que limitam a atividade microbiana durante o processo de Biorremediação, como, por exemplo: teor de nutrientes, concentração de oxigênio, temperatura, pH, teor de umidade, concentração e composição dos contaminantes, dentre outros. Desta forma, a etapa de caracterização do solo e ajuste dos parâmetros mencionados é fundamental para que a tecnologia de Biorremediação escolhida e o processo como um todo sejam executados com êxito (BELSER, 1979; WOLIN, 1987; LOVLEY, 1991; MROZIK & SEGET, 2009).

4. Tecnologias da Biorremediação *in situ*

4.1. Bioventing ou Bioventilação

“Bioventing” é uma técnica recente e promissora, que se baseia no estímulo da degradação *in situ* de qualquer composto degradável aerobicamente, através do fornecimento de oxigênio aos micro-organismos presentes no solo e, normalmente, consiste no uso de ar atmosférico para aumentar a atividade de micro-organismos aeróbios na remediação de áreas contaminadas. Esta tecnologia tem sido usada no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos derivados do petróleo, solventes não clorados, alguns pesticidas, conservantes de madeira, entre outros orgânicos. Entretanto, a proximidade da superfície do nível freático, a existência de zonas saturadas, ou a baixa permeabilidade do solo reduzem a eficiência desta técnica. Esta tecnologia é vantajosa por ser um tratamento *in situ* e, também, por requerer pouca quantidade de equipamentos. Solos com baixa permeabilidade, tais como os argilosos, não se adaptam para a utilização desta tecnologia, pois não se consegue suprimento de

ar, rápido e adequado, para atender às necessidades de oxigênio para o metabolismo microbiano (ALEXANDER, 1999).

4.2. Fitorremediação

Dentre os processos biológicos, insere-se a fitorremediação, que envolve o emprego de plantas como agentes despoluidores de solo ou águas. Sua utilização tem sido avaliada, principalmente, em solos contaminados com metais pesados (ACICIOLY & SIQUEIRA, 2000) além dos tratamentos em solos contaminados por petróleo e seus derivados e outros compostos orgânicos (ANDERSON & WALTON, 1995; CUNNINGHAM *et al.*, 1996; CORSEUIL & MORENO, 2001). Em geral, é mais difícil trabalhar com contaminantes orgânicos, em razão da diversidade molecular, da complexidade de análise e das constantes transformações a que estão sujeitos. Neste contexto, os metais pesados são mais facilmente quantificados e raramente formam metabólitos intermediários no solo, como ocorre na biodegradação dos contaminantes orgânicos. Assim, as pesquisas com compostos orgânicos contaminantes de solo exigem técnicas especializadas e de custo mais elevado do que as utilizadas no tratamento de solos contaminados com metais pesados, envolvendo o uso de elementos marcados e sofisticada instrumentação analítica (PIRES *et al.*, 2005).

Nos solos os principais mecanismos da fitorremediação são: a fitoextração, fitoestabilização, fitovolatilização e a fitodegradação.

A fitoextração, também reconhecida como fitoacumulação, é a absorção do contaminante pelas raízes para o tronco e as folhas. A fitoestabilização, por sua vez, usa plantas para limitar a mobilidade ou a biodisponibilidade dos contaminantes. Um outro mecanismo de remoção dos contaminantes pela ação de plantas é a fitoevaporação, que está fundamentada no equilíbrio de transferência de massas dos contaminantes,

principalmente orgânicos e metalóides, das partes do vegetal para a atmosfera. A fitodegradação é a rota caracterizada capacidade dos vegetais em degradar os contaminantes, que podem ser transformados em fonte de energia ao crescimento das plantas (ANSELMO & JONES, 2005).

4.3. Atenuação Natural Monitorada

O processo de atenuação natural monitorada (ANM) é baseado nos princípios naturais de degradação *in situ* e resulta da interação de uma série de processos químicos, físicos e biológicos. Em condições favoráveis, a biodegradação dos contaminantes ocorre sem intervenção humana para reduzir a massa, toxicidade, mobilidade, volume ou concentração desses contaminantes em solos ou aquíferos. Essa tecnologia demanda, normalmente, um tempo maior para atingir os valores estabelecidos pela lei ambiental (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000).

Quando não há risco que justifique a adoção de tratamento para acelerar a remediação da área, o melhor a fazer é deixar a natureza se autodepurar, ou seja, optar pela chamada Atenuação Natural Monitorada (NOBRE & NOBRE, 2003; FURTADO, 2006). A biodegradação natural pode ser indicada para compostos orgânicos voláteis (VOCs), semivoláteis (SVOCs) e combustíveis à base de hidrocarbonetos (U.S. EPA, 1995, *apud* BAPTISTA 2007). Algumas desvantagens desse tratamento são: a caracterização (avaliação das condições geológicas e geoquímicas) e o monitoramento do local contaminado por um longo período, elevando, assim, os custos do tratamento; os produtos finais podem ser mais tóxicos que os contaminantes originais; pode haver a migração do contaminante no solo antes da degradação causando, por exemplo, erosão, volatilização e lixiviação (BAPTISTA, 2007).

Em geral, o processo de ANM está diretamente relacionado a cinco mecanismos: a) biodegradação; b) transformação química (hidrólise e desalogenação; c) estabilização dos contaminantes em, por exemplo, argila e materiais úmidos que dificultam e impedem a migração do contaminante; d) volatilização, que embora seja um componente de menor intensidade no processo de atenuação natural, permite a transferência de compostos orgânicos voláteis para a atmosfera; e) Dispersão.

5. Tecnologias da Biorremediação ex situ

5.1. Landfarming

"*Landfarming*" é uma tecnologia de remediação que consiste na aplicação do resíduo oleoso na superfície do solo, de modo a reduzir as concentrações dos constituintes de petróleo por meio da biodegradação microbiana. O espalhamento do material oleoso contaminante sobre o solo e a incorporação na camada arável, também denominada camada reativa, pode afetar, diretamente e de modo diferenciado, os micro-organismos responsáveis pela biodegradação. A biodegradação microbiana, que é o mecanismo primário de eliminação dos poluentes orgânicos do ambiente, compõe a base deste tratamento, sendo de grande importância a manutenção de uma comunidade microbiana heterotrófica ativa, no entanto, são escassos os estudos relacionados à atividade dos micro-organismos em áreas de tratamento de resíduo petroquímico por "*landfarming*" (DE PAULA *et al.*, 2006; SILVA, 2009).

5.2. Biopilhas

A Tecnologia de Biopilhas envolve a construção de células ou pilhas de solo contaminado de forma a estimular a atividade microbiana aeróbia dentro da pilha através de uma aeração eficiente. A atividade microbiana pode ser aumentada pela adição de água e nutrientes como fontes de nitrogênio e de fósforo. Os micro-

organismos degradam os hidrocarbonetos adsorvidos nas partículas de solo, reduzindo, assim, suas concentrações. Tipicamente, as Biopilhas são construídas sobre uma base impermeável para reduzir a de migração dos lixiviados para o ambiente subsuperficial. Uma malha de dutos perfurados instalados na base da pilha e conectados a um compressor garante a perfeita aeração do conjunto. Em alguns casos, constrói-se um sistema de coleta do lixiviado, principalmente, quando se utiliza um sistema de ajuste de umidade. As pilhas são, geralmente, recobertas por plástico para evitar a liberação de contaminantes para a atmosfera, bem como para protegê-la das intempéries.

A Biopilha necessita de espaço suficiente para o tratamento do solo contaminado e, além disso, ao escavar o solo, pode-se liberar para o ambiente compostos orgânicos voláteis (VOCs) (PALA, 2002; SEABRA, 2005). Convém destacar que o emprego de materiais orgânicos oriundos dos resíduos sólidos urbanos pode favorecer a degradação de hidrocarbonetos nas biopilhas, por aumentar a população microbiana. No entanto, no primeiro momento, pode ocorrer a degradação preferencial de carboidratos ao invés de hidrocarbonetos (SEMPLE et al., 2001).

5.3. Biorreatores

Biorreatores de vários tipos têm sido desenvolvidos principalmente para o tratamento de efluentes líquidos, entretanto tais sistemas também estão sendo usados para resíduos sólidos (URURAHY, 1998). Os custos são mais altos do que os tratamentos *in situ*, pois há gastos adicionais com o transporte do material contaminado, construção de equipamentos para uma particular descontaminação, mão-de-obra adicional e energia. No entanto, também podem ser extremamente úteis em degradar compostos altamente recalcitrantes (RISER-ROBERT, 1998).

Alem disso os biorreatores facilitam o controle do processo de biodegradação dos poluentes no solo, facilitando a aclimatação da microbiota e seu desenvolvimento. O emprego dos biorreatores vem surgindo como uma tecnologia viável e decisiva para tratamento de solos contaminados com compostos orgânicos (URURAHY, 1998). BAPTISTA *et al.* (2006), utilizaram reatores de leito fixo para tratamento de solo argiloso contaminado com hidrocarbonetos de petróleo e verificaram uma remoção de cerca de 45% de Hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) após 45 dias de tratamento.

O reator de lama é uma técnica que envolve o tratamento controlado do solo escavado em reator biológico. O solo é primeiramente processado de modo a separar fisicamente os componentes de maiores dimensões. Em seguida, adiciona-se água até um volume pré-determinado, e essa adição é dependente da concentração dos contaminantes, da velocidade da degradação biológica e da natureza do solo. A fração arenosa, já limpa, é retirada do sistema, restando a fração de finos e a água de lavagem, que serão tratados biologicamente. O solo é mantido em suspensão no reator e misturado com nutrientes e oxigênio e, se necessário é feita a correção de pH. Após a degradação completa procede-se à secagem das lamas (DE PAULA *et al.*, 2006). Para que este processo apresente a eficiência requerida, faz-se necessária a adição de nutrientes, especialmente fontes de nitrogênio, fósforo e potássio, pois o aumento da concentração de carbono orgânico no solo aumenta a demanda de nutrientes pelos micro-organismos (PAUDYN *et al.*, 2007).

Também podem ser feitas outras adequações no solo que incluem a adição de água para aumentar a umidade, e a adição de óxidos de cálcio e/ou magnésio para corrigir o pH. Em geral, ocorre maior degradação de hidrocarbonetos em solo de pH neutro, pois as bactérias são reconhecidamente os principais agentes da biodegradação (MPHEKGO & CLOETE, 2004).

5.4. Compostagem

A técnica de compostagem é uma variante do *landfarming*. Nesta tecnologia ocorre a adição de um agente estruturante a fim de aumentar a sua permeabilidade, e conseqüentemente promover maior taxa de transferência de oxigênio. Normalmente, utilizam-se os seguintes materiais como agentes estruturantes: palha, pedaços de grama e madeira, folhas, bagaço de cana e serragem. Devido à natureza orgânica destes materiais, os agentes estruturantes atuam como fontes de carbono capazes de favorecer o rápido estabelecimento de uma população numerosa (RISER-ROBERT, 1998). Porém, às vezes, a biodegradação do poluente é prejudicada pela utilização destes agentes pelos micro-organismos lignolíticos levando a problemas de competição entre as espécies microbianas (SEMPLE *et al.*, 2001).

6. Fatores que influenciam a Biorremediação

A efetividade da Biorremediação depende principalmente de algumas limitações determinadas por fatores que são decorrentes em ambientes tanto frios quanto quentes. Estes fatores segundo BOOPATHY (2000) podem ser técnicos ou não técnicos dependentemente da influência direta ou indireta que possam exercer no processo de Biorremediação.

6.1. Fatores Técnicos que afetam a Biorremediação

6.1.1. Temperatura

A temperatura apresenta efeito particular na colonização microbiana e, conseqüentemente, na degradação de hidrocarbonetos residuais após a evaporação de água e de frações mais leves de hidrocarbonetos. A temperatura ambiente influencia a natureza física e química da composição do óleo, a taxa de degradação de hidrocarbonetos, e a composição da comunidade microbiana, assim como a

transferência de massa de substrato e/ou aceptores de elétrons na zona fria, em que é crucial a adaptação microbiana e, logo, atua no processo de biorremediação. Zonas com baixas temperaturas retardam a taxa de evaporação dos componentes voláteis, e portanto, atrasam a biodegradação do óleo (ATLAS, 1981; OSTROUMOV & SIEGERT, 1996; AISLABIE *et. al.*, 2006).

A temperatura do solo pode afetar de forma significativa a taxa de degradação. A flutuação, e freqüente variação de temperatura diferem de um local a outro e a biodegradação resultante pode ser diversa.

ATLAS (1981) observou, por exemplo, que a degradação de hidrocarbonetos foi mais rápida a 25°C do que a 5°C. BALKS *et al.* (2002) ,por outro lado, relatam que a biodegradação de combustíveis pesados, por organismos autóctones do mar norte, foi quatro vezes superior no verão (18°C) do que no inverno (4°C). SIRON *et al.* (1995), acrescentam que em ambiente ártico/subártico, a biodegradação de hidrocarbonetos diminui durante o inverno, estando a temperatura limiar para uma significativa biodegradação de óleo em torno de 0°C. É ainda importante acrescentar que, em temperaturas mais elevadas pode ocorrer a inativação de enzimas e/ou inviabilidade de alguns micro-organismos, o que também limita o tratamento por biorremediação (ATLAS, 1995).

Todavia, embora a atividade de biodegradação microbiana não cesse em temperaturas abaixo de zero, a temperatura ótima para a biodegradação é geralmente entre 15-30°C para os processos aeróbios e 25-35°C para os anaeróbios. Deste modo, a temperatura de solos das regiões glaciares não é favorável. No entanto, a biorremediação pode ser vantajosa em estações quentes, já que os meses quentes apresentam as melhores taxas de degradação (RAWÉ *et. al.*,1993; AISLABIE *et. al.*, 2006).

6.1.2. Biodisponibilidade

A biodisponibilidade é a tendência dos componentes individuais existentes no óleo em serem capturados pelos micro-organismos. No que diz respeito a esses organismos, as dificuldades relativas à biodisponibilidade são provenientes dos obstáculos que existem na transferência de hidrocarbonetos para o interior das células enzimáticas e nas limitações energéticas para manter a degradação (YANG *et. al.*, 2009). O acesso dos hidrocarbonetos ao sistema celular enzimático constitui um obstáculo porque a biodegradação de substâncias químicas depende do arsenal enzimático existente dentro das células bacterianas. Por outro lado, os micro-organismos podem ser metabolicamente ativos apenas quando ocorre a transferência de massa na membrana celular. Deste modo, quando a temperatura ambiente cai até o ponto de congelamento, os canais iônicos, responsáveis pela permeabilidade seletiva da membrana, tende a fechar e o citoplasma sofre estresse criogênico. Ou seja, se a temperatura continua caindo, as funções celulares diminuem, afetando o desenvolvimento celular, e com o congelamento da matriz citoplasmática, a célula pára de funcionar. O estresse que resulta no fechamento do canal de transporte das células ou congelamento do citoplasma, é muito comum em condições extremas e pode restringir o transporte de massa e limitar o acesso de nutrientes às células (FINEGOLD, 1996).

A solubilidade aquosa do poluente é importante na biorremediação porque a adsorção do solo é diretamente proporcional ao coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) e inversamente proporcional a solubilidade aquosa. Quando um composto é fortemente adsorvido no solo, a biodisponibilidade tende a diminuir, impedindo consequentemente a biodegradação.

O valor de \log_{ow} é um bom indicador geral para a solubilidade de um contaminante em membranas biológicas, principalmente no que diz respeito aos lipídios

de membrana. Contaminantes com $\log K_{ow}$ entre 1 a 3.5 tendem a ter altas taxas de biodegradação em condições aeróbias e anaeróbias (BESSLER & GRAY, 2003). Por outro lado a limitação da transferência de massa determina a taxa máxima de biorremediação de contaminantes que possuem solubilidade muito baixa (OSTROUMOV & SIEGERT, 1996).

6.1.3. Textura e Estrutura do Solo

A metabolização e a biodegradação de muitos poluentes podem ser limitadas pela sorção dos compostos aos componentes do solo. Assim, se os compostos encontram-se fortemente sorvidos, eles podem se apresentar indisponíveis aos micro-organismos, limitando assim a sua biodegradação (RIZZO *et. al.*, 2006).

Deste modo, a textura e a estrutura do solo são parâmetros que influenciam na biodisponibilidade do hidrocarboneto, visto que os solos que apresentam partículas maiores resultam em maior porosidade viabilizando a dispersão dos micro-organismos no interior dos poros (RIBEIRO *et. al.*, 2004). Além disso, a textura do solo contaminado determina, em grande parte, a umidade ótima requerida para a operação de biorreatores, variável que se encontra intimamente relacionada ao grau de mistura e à aglomeração (WOO & PARK 1999 *apud* RIZZO *et. al.*, 2006).

6.1.4. Limitações Metabólicas

As limitações metabólicas podem resultar da interação enzima-substrato e da energia necessária para ativar o metabolismo. Se a enzima específica existir, a taxa de degradação pode, entretanto ser determinada por interações específicas do composto com a enzima. No geral, as limitações enzimáticas resultam do reconhecimento do substrato e do impedimento estérico do substrato porque o reconhecimento e a

aproximação são requeridos na catalise enzimática. Sendo assim, quanto mais extenso for o tamanho do composto, maior será o impedimento estérico, e maiores serão as dificuldades que existirão na interação do substrato com o centro ativo da enzima requerida no processo metabólico (SCHWARZENBACH *et al.*, 1993; BESSLER & GRAY, 2003). Outro ponto a ser considerado, é o fato de que os derivados substituídos inibir atividade enzimática, principalmente devido ao impedimento estérico da interação enzima-substrato (KROPP & FEDORAK, 1998). Essas reações requerem a ativação de energia produzida pelos micro-organismos, e o nível de consumo dessa energia pode servir como indicador do nível de biorremediação. Logo, baixos níveis de adenosina trifosfato (ATP) no local onde ocorreu vazamento com óleo podem indicar consideravelmente baixos níveis de biomassa microbiana ou baixa atividade microbiana (SPARROW e SPARROW, 1988).

6.1.5. Oxigênio

O oxigênio é usualmente utilizado como acceptor final de elétrons no metabolismo aeróbio e, a limitação de oxigênio é uma das razões cruciais para o insucesso da biorremediação em regiões glaciares.

A importância do oxigênio surge da participação da oxigenase e do oxigênio molecular envolvido na maioria das rotas de degradação dos hidrocarbonetos. Os processos aeróbios geram maior potencial energético formado por unidade de substrato e tendem a ocorrer consideravelmente mais rapidamente. A teoria sugere que a massa de oxigênio necessária para remediar a carga poluente é de cerca de 0,3 g de oxigênio por cada grama de óleo oxidado (ATLAS, 1981).

A demanda de oxigênio é, entretanto uma limitação comum em zonas glaciares devido à escassez de oxigênio posto que nessas regiões, a difusão de oxigênio é parcial

ou completamente bloqueada. O transporte de oxigênio é considerado uma etapa limitante na taxa de biorremediação aeróbia. Quando o oxigênio é mais rapidamente consumido do que substituído por difusão da atmosfera, o solo se torna um ambiente anaeróbio. Nestas circunstâncias, a degradação aeróbica será limitada, e a taxa de transformação diminuirá favorecendo aos organismos anaeróbios a se tornarem gradualmente populações dominantes. Portanto, técnicas de engenharia são frequentemente utilizadas com a finalidade de melhorar a demanda de oxigênio dos sistemas de tratamento tanto *ex situ* quanto *in situ* (RAWWE *et al.*, 1993; BRADDOCK *et al.*, 1997; ATLAS, 1981; BRESSLER & GRAY, 2003).

6.1.6. Aceptores alternados de elétrons

Os organismos aeróbios utilizam oxigênio elementar como acceptor final de elétrons. Os anaeróbios utilizam nitratos, sulfatos, CO₂, e metais ferrosos como aceptores finais de elétrons, e geralmente têm um único mecanismo de reação na profundidade do subsolo, onde a rota anaeróbia é susceptível de ser meritória para degradar alguns compostos resistentes. Quando o oxigênio molecular está ausente, o oxigênio derivado da água serve como um reagente, e uma série alternativa de aceptores de elétrons podem ser utilizados (ALLARD & NEILSON, 1997). Os aceptores de elétrons são geralmente utilizados na seqüência relatada pela energia formada por unidade de carbono orgânico oxidado na seguinte ordem: O₂, NO₃⁻, Mn²⁺, Fe³⁺, SO₄²⁻ e CO₂ (SPENCE *et al.*, 2005). A seqüência de reações esperadas para ocorrer tem início com a respiração aeróbia, seguida da desnitrificação, redução de manganês, redução férrica, redução de sulfato, e finalmente metanogênese (SCHWAZENBACH *et al.*, 1993).

6.1.7. Nutrientes

O estado dos nutrientes no solo causa um impacto direto na atividade microbiana e na biodegradação. Um grupo de elementos nutrientes ou compostos orgânicos é requerido como fonte de carbono ou doador/aceptor de elétrons. Alguns elementos são importantes no processo de biorremediação como, nitrogênio e fósforo, respectivamente, e baixas concentrações de alguns aminoácidos, vitaminas, ou outras moléculas orgânicas, podendo ser adicionados ao processo para melhoria do potencial de biodegradação (HOMASSIN-LACROIX, 2000). Além disso, os vazamentos de grandes quantidades de contaminante de petróleo tendem a resultar num rápido esgotamento da disponibilidade de nitrogênio e fósforo inorgânico. Nitrogênio e fósforo, geralmente, se tornam fatores limitantes especialmente quando o contaminante atua como fonte de carbono (RÖLING & VAN VERSEVELD, 2002). Com base na estequiometria de Redfield, quando os nutrientes não são limitantes, a razão desejada de C, N, P e K é 100:15:1:1 (FILLER *et al.*, 2006).

Em alguns casos, para que haja a correção desses nutrientes essenciais ao metabolismo microbiano, pode-se lançar mão do uso de fertilizantes, pois esses possuem quantidades limitadas tanto de nitrogênio quanto de fósforo. No caso dos altos níveis de nitrogênio, por exemplo, razões de C/N menores que 20, pode haver inibição da atividade microbiana do solo possivelmente devido à toxicidade nítrica (THOMASSIN-LACROIX, 2000).

6.1.8. Toxicidade

Experimentos mostram que líquenes, musgos e plantas sofrem uma mortalidade particularmente pesada pela toxicidade. O manto hidrofóbico de óleo, ao recobrir líquenes, musgos e plantas, pode perturbar a captura de nutrientes. O vazamento de óleo

é tóxico para as aves, os peixes, os ovos, e as larvas, e pode ser transferido através dos alimentos. Geralmente a toxicidade depende da composição do petróleo e da concentração. Produtos refinados de óleo, por exemplo, são considerados mais tóxicos para plantas de cobertura do que os óleos crus (JENKINS *et al.*, 1978).

A toxicidade aguda frequentemente resulta de alcanos e compostos aromáticos de baixo peso molecular, enquanto a toxicidade crônica parte dos HPAs. A toxicidade também é relacionada à temperatura ambiente e a consequente intempérie dos compostos voláteis. Com o aumento da temperatura do ar, mais componentes tóxicos são perdidos por meio da intempérie. Quando o óleo congela no ambiente, a volatilização dos alcanos com cadeias curtas é reduzida, e a sua solubilidade em água aumenta. Adicionalmente, os hidrocarbonetos têm o potencial de aumentar a hidrofobidade do solo (BALKS *et al.*, 2002).

Os micro-organismos são capazes de degradar um contaminante quando a sua concentração está abaixo da toxicidade limite, mas seu crescimento e disponibilidade são restritos quando o contaminante está acima da concentração limite (BLESSER & GRAY, 2003). Deste modo, se um ambiente contaminado é quase letal aos micro-organismos, a biodegradação não pode ser implementada, e os métodos especiais de engenharia precisam ser empregados para extrair e diluir a concentração inicial para a posterior biodegradação.

6.1.9. pH

O pH do solo tem ação direta na atividade metabólica da microbiota nele existente, sendo função da tolerância de cada espécie microbiana. Segundo TSAI *et al.* (1992), em relação ao pH, os micro-organismos podem ser distinguidos como:

- Indiferentes - crescem numa faixa ampla de valores de pH. É o caso de um grande número de bactérias, que podem apresentar crescimento entre valores de pH 6 a 9. Para os fungos os valores variam entre 2,0 e 8,0;

- Neutrófilos - preferem pH próximo à neutralidade até ligeiramente alcalino. Em geral, as cianobactérias e algumas diatomáceas preferem ambientes neutros ou pouco alcalinos. Já a maioria dos actinomicetos não apresenta crescimento em valores de pH inferiores a 5,5;

- Acidófilos - preferem ambientes com pH ácido;

- Basófilos - não suportam valores de pH inferiores a 8,0.

Para a maioria dos micro-organismos envolvidos no processo de biorremediação, a faixa de pH favorável ao seu crescimento é de 6,0 a 8,0, quando a biodegradação tende a ser mais rápida (ATLAS, 1989; ALEXANDER, 1999). Em ambientes de extrema acidez ou alcalinidade, a atividade microbiana decai. Isto acontece porque independente do pH do meio externo, o pH citoplasmático dos micro-organismos precisa ser 7,0 e a manutenção deste valor, ou outro muito próximo a este, se faz necessário, pois uma mudança no estado de ionização dos grupos químicos do sítio ativo ou a eliminação de interações iônicas alteram a conformação ativa e a estabilidade das enzimas e, por consequência, reduzem drasticamente sua atividade (LEHNINGER, 1995).

6.1.10. Concentração de Micro-organismos Degradadores de Hidrocarbonetos

O sucesso da biorremediação é dependente da diversidade da população microbiana presente, mais especificamente da disponibilidade de micro-organismos hidrocarbonoclasticos (PAUDYN *et al.*, 2007), por existir uma relação direta entre a

taxa de degradação e o tamanho da população, já que quanto maior o número de micro-organismos capazes de degradar o composto, mais rápida será a sua degradação. O tamanho da população microbiana é maior na superfície do solo, visto que nesta região a temperatura, umidade, aeração e energia são relativamente mais favoráveis para o desenvolvimento dos micro-organismos (VIDALLI, 2001).

6.2. Fatores não Técnicos que afetam a Biorremediação

São vários os fatores não técnicos que impedem o desenvolvimento da tecnologia de biorremediação e alguns destes fatores são a seguir discutidos.

6.2.1. Pesquisa e fatores técnicos

Embora exista um número de contaminantes biodegradáveis, incluindo hidrocarbonetos de petróleo, álcoois e solventes, várias substâncias químicas amplamente aceitas como os Bifenilas Policloradas (PCBs), pesticidas, alcatrão de carvão, solventes clorados, e hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, não são degradados prontamente. Apesar dos poucos recursos para pesquisa sobre as tecnologias de biorremediação, ainda há a necessidade de que mais trabalhos sejam desenvolvidos nessa área com a finalidade de não só melhor entender como ocorre o processo de biodegradação, como também desenvolver melhorias nas tecnologias já existentes. (BOOPATHY, 2000).

6.2.2. Recursos Humanos

Devido ao fato da biorremediação ser uma tecnologia relativamente pouco estudada, existe uma ausência de recursos humanos treinados nesta área. Um programa de biorremediação bem sucedido requer uma multidão de ferramentas disciplinares,

integrando áreas como microbiologia, engenharia, geologia, hidrogeologia, ciência de solos e projetos de gerenciamento. (BOOPATHY, 2000).

6.2.3. Econômicos e Legais

Ao contrário de outras indústrias, a biorremediação não resulta na geração de produtos de valor agregado. Assim, o capital de risco investido em tecnologia tem sido lento, e como consequência a atividade comercial em pesquisa e desenvolvimento tem sido muito atrasada em relação a outros setores da indústria. Assim, como a biorremediação é ainda considerada uma tecnologia nova, clientes e agências reguladoras, muitas vezes examinam mais detalhadamente a biorremediação do que as tecnologias convencionais (BOOPATHY, 2000).

7. Técnicas de Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo

Existem basicamente duas técnicas de utilização da biorremediação que podem ser utilizadas isoladamente ou em conjunto, dependendo das características do contaminante e do solo que são o bioestímulo e o bioaumento.

O bioestímulo, também denominado de bioestimulação, visa aumentar os micro-organismos autóctones e acelerar a taxa de biodegradação natural pela adequação das quantidades de nutrientes e/ou melhorar a biodisponibilidade de contaminantes em ambientes tanto quentes quanto frios. Se a ocorrência correta, e natural dos micro-organismos presentes estiverem em número e tipo suficientes, os micro-organismos podem quebrar os resíduos de forma eficaz. A técnica mais utilizada é a de adicionar nutrientes inorgânicos ou fertilizantes oleofílicos, que supostamente têm um efeito positivo para a descontaminação do petróleo (ALLARD & NEILSON, 1997). A

bioestimulação é popularmente confiável para estimular a degradação da biomassa de hidrocarbonetos e ainda influenciar a composição relativa de comunidades microbianas. Estudos foram realizados sobre a biodegradação de petróleo no Ártico frio (PRITCHARD & COSTA, 1991) na Antártica (KERRY, 1993) e em clima quente e úmido na região amazônica (SILVA, 2009). Todos os autores relatam um efeito favorável da adição de nutrientes quando a aeração foi fornecida.

Durante o tratamento de biorremediação, é importante monitorar a disponibilidade de nitrogênio e fósforo e a concentração de potássio. No entanto, o grau em que a disponibilidade de oxigênio e nitrogênio pode limitar a biodegradação e o intervalo adequado para re-suprimento de oxigênio e nitrogênio são incertos. Também é difícil saber a eficácia de fertilizantes para estimular a biodegradação do óleo, se os dados de base são desconhecidos. Além disso, a proporção de C/N para fertilizar é altamente dependente da situação real no solo contaminado. As razões recomendadas de C/N para biorremediação de hidrocarbonetos do solo variam grandemente e alcançam, pelo menos, faixas que compreendem de 100:1 a 10:1 (ATLAS & BARTHA, 1992) embora uma faixa de trabalho de uma relação C/N de 100:15 seja frequentemente usada (MOSBECH, 2002).

Em relação ao bioaumento, a literatura reporta que o aumento na inoculação de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, em áreas contaminadas com óleo, tem sido testado em alguns ambientes terrestres (MØLLER *et al.*, 1995; MARGESIN & SCHINNER, 1999). Normalmente, a inoculação tem sido feita para aumentar as concentrações de bactérias no início dos experimentos, com efeito marginal nas concentrações finais. No entanto, alguns estudos experimentais em solos alpinos frios e cronicamente poluídos com óleo esclarecem que o aumento com biodegradadores adaptados ao frio não foi bem sucedida (MARGESIN & SCHINNER, 1997).

“Bioventing” simulando o sistema frio de solo alpino mostrou diminuição na utilização de hidrocarbonetos pelo inóculo no solo com aumento da degradação pelos micro-organismos autóctones do solo à medida que o tempo de incubação e a temperatura foram aumentando (MARGESIN & SCHINNER, 1999). No entanto, muitas vezes falhou na melhoria das taxas de degradação de hidrocarbonetos ou na remoção de hidrocarbonetos totais (MØLLER *et al.*, 1995; VOGEL, 1996; ALLARD & NEILSON, 1997).

Geralmente, o método é útil apenas quando se pode de forma positiva melhorar a biorremediação porque os micro-organismos introduzidos são sujeitos a vários estresses abióticos e bióticos. Os micro-organismos inoculados provavelmente serão suplantados pelos organismos autóctones, em alguns casos. Teoricamente, a biotecnologia moderna pode ser usada para ajudar a aliviar essa repressão metabólica. No entanto, não é claro se isso levará a perturbação na composição da comunidade e, portanto, é necessário avaliar a diversidade da população microbiana.

CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. O Solo

Para a realização dos experimentos foi utilizado solo proveniente do norte de Angola, na região do Soyo, município da província do Zaire, em Angola. O clima da região é tropical úmido e a temperatura média anual varia entre 24 e 26 °C.

Foram coletadas dez amostras de solo contaminado com óleo cru Angolano e dez amostras de solo não contaminado em uma zona próxima ao mar, perfazendo um total de vinte amostras de solo Angolano. Cada amostra continha 500g de solo e foram embaladas em sacos plásticos que foram identificados e inseridos em caixa térmica a 5°C para o transporte aéreo até o Rio de Janeiro, Brasil.

Por se tratar de solo, os processos de importação e exportação para os testes foram autorizados pelos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) da Republica Federativa do Brasil, e pelo Ministério do Ambiente da Republica de Angola.

Após os testes, as amostras foram autoclavadas a 121 °C por 30 minutos e, em seguida, descartadas, por incineração, pela UFRJ.

3.2. Testes de biorremediação do solo

Todos os testes de biorremediação foram executados em recipientes plásticos, com dimensões de 20 cm de largura, 20 cm de comprimento e 8 cm de altura. Cada recipiente contendo solo foi denominado como reator.

Antes da realização dos experimentos, os solos foram peneirados para remoção de partículas de maior tamanho, usando peneira de abertura regular de 1 mm, e homogeneizados com auxílio de bastão de vidro.

É importante referir que ao longo de todos os testes, os solos foram agitados diariamente permitindo uma maior aeração dos sistemas, por revolvimento, com auxílio de bastão de vidro.

Todos os testes foram realizados suplementando o solo com fertilizante (10:10:10, da VITAPLAN, Brasil) a fim de se obter uma relação inicial de C/N: 100/10

Todos os reatores foram enriquecidos com micro-organismos. A inoculação foi realizada no início dos experimentos e foram usados os micro-organismos cultivados em condições aeróbias, obtidos a partir de água da Baía de Guanabara, coletadas na Praia do Galeão, na Ilha do Governador. O pré-inóculo foi obtido inoculando de 1mL da água do mar em caldo nutriente, e incubado a 28°C por 48 horas. Para o bioaumento foram inseridos, em cada reator, 15mL do inoculo recém preparado. Todos os testes de biorremediação foram conduzidos durante 90 dias.

3.2.1. Experimentos com solo contaminado “in natura”.

Este conjunto de experimentos teve o objetivo avaliar a viabilidade da biorremediação do solo contaminado *in natura*, ou seja, nas condições de contaminação em que ele foi amostrado em Angola. Em ambos os reatores, distribuíram-se 500g de solo contaminado *in natura*. A Figura 3 apresenta os dois reatores utilizados para a realização dos testes.



Figura 3. Reatores utilizados para realização do experimento com o solo contaminado com óleo (*in natura*).

3.2.2. Experimentos com variação no teor inicial de óleo cru

A Figura 4 apresenta os três reatores utilizados para a realização dos experimentos com variação no teor inicial de óleo.



Figura 4. Recipientes de plástico utilizados para realização dos experimentos variando-se os teores do solo contaminado.

Este conjunto de experimentos teve como objetivo avaliar o efeito da concentração do contaminante no sistema, uma das variáveis que influenciam a biorremediação de solos (Del-Arco & de França, 2001). Em cada reator foi colocado uma massa de 300g de solo não contaminado. Para variar a quantidade inicial de hidrocarbonetos em cada reator, foram adicionados 30, 60 ou 120g de solo contaminado equivalendo a um percentual mássico de mistura solo contaminado e solo não contaminado de 9, 17 e 27%, respectivamente.

3.2.3. Monitoramento dos testes de biorremediação

Para acompanhamento de todos os testes de biorremediação, foi montado um programa de monitoramento que envolveu a realização de vários testes analíticos, a seguir discriminados:

- pH em água, em 0 e 90 dias de processo.
- Umidade, semanalmente.
- HTP, em 0 e 90 dias de processo.
- HPA, em 0 e 90 dias de processo.

-
- Bactérias Aeróbias Heterotróficas (BAE), quinzenalmente.
 - Bactérias Anaeróbias Heterotróficas (BAN), quinzenalmente.
 - Fungos Totais, quinzenalmente.

3.3. Análises Físicas

A determinação das análises físicas do solo, em relação à umidade do pH foram feitas no Laboratório E-109, de Microbiologia Aplicada à Indústria do Petróleo da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.3.1. Umidade

O ensaio da determinação da umidade do solo foi baseado na metodologia 1.3 utilizada pela EMPRAPA (1979). Para tal, amostras do solo foram transferidas para becker de teflon com capacidade para 25 mL, de massa conhecido. Após a pesagem inicial, os sistemas foram levados para estufa (Tecnal TE-395) a 105°C por 24h. Passado este período, os sistemas foram inseridos em dessecador com sílica gel ativa e a massa seca do solo foi determinada na mesma balança. A umidade foi calculada como peso constante da diferença entre a massa úmida e a massa seca e o resultado expresso em percentual de acordo com a seguinte fórmula:

$$U = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \times 100$$

Onde: U - umidade; m_i - massa inicial da amostra, em gramas e m_f - massa final da amostra, em gramas, após a secagem. O ensaio foi conduzido em triplicata e as pesagens realizadas em balança analítica (TDS FA2104N).

3.3.2. Granulometria

A distribuição granulométrica do solo foi determinada em Laboratório externo à Universidade Federal do Rio de Janeiro. O ensaio foi executado seguindo-se os procedimentos descritos por EMBRAPA (1997), que envolve o peneiramento do solo para quantificação das frações de areia e de cascalho, como também testes de sedimentação para estabelecimento da quantidade de argila e silte.

3.4. Análises Químicas

Foram realizadas análises químicas para acompanhar o processo de tratamento dos solos. Todas as análises foram feitas com base nas metodologias analíticas da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U. S. Environmental Protection Agency – USEPA), por este ser um órgão de referência internacional. O pH dos solos, no entanto, seguiu a metodologia desenvolvida por EMBRAPA (1979), devido à sua simplicidade de execução.

3.4.1. pH

Para determinação do pH do solo em água, foram realizados ensaios baseados na metodologia 2.1.1 utilizada pela EMPRAPA (1979). Em um becker com capacidade para 50 mL, foram adicionados 10 g de solo e 25 mL de água destilada.

A mistura foi homogeneizada durante 30 minutos com auxílio de agitador magnético revestido de teflon. Após o período de repouso, para separação das fases, o decantado foi transferido para um becker com capacidade para 25 mL e o pH foi determinado em potenciômetro (Digimed DM-20), previamente ajustado com soluções tampão padronizadas de pH = 4,00 e pH = 7,00.

3.4.2. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)

Para determinação dos HPA foi utilizada a metodologia USEPA 8270D (Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry - GC/MS). A cromatografia foi realizada em equipamento modelo Thermo Finnigan – Focus GC, equipado com coluna RTX-5MS (30 m x 0,25 mm) e acoplado a um espectrômetro de massa Thermo Finnigan – Focus DSQ). Os extratos orgânicos foram obtidos de acordo com o método USEPA 3550, que utiliza ultrassom, com Diclorometano seco. A purga do solvente para a concentração foi feita com fluxo de Nitrogênio. Foram analisados os seguintes compostos: Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Criseno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Indeno[1,2,3-cd]pireno, Dibenzo[a,h]antraceno e Benzo[ghi]perileno.

3.4.3. Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (HTP)

A quantificação de HTP foi realizada pelo método USEPA 8015C (*Nonhalogenated organics using GC/FID*). Os compostos alvos para análise de HTP compreendem *n*-alcanos na faixa de C₁₀ a C₃₆ incluindo pristano e fitano. A cromatografia foi realizada em um equipamento Thermo Finnigan – Focus GC, equipado com coluna RTX-5MS (30 m x 0,25 mm) e com detector de ionização de chama (FID). A integração foi realizada para que os valores de HTP total considerassem os resultados de HTP nas faixas de gasolina, querosene, diesel e óleo combustível, assim como a mistura complexa não resolvida (MCNR) no cromatograma.

Os extratos orgânicos foram obtidos de acordo com o método USEPA 3550, que utiliza ultrassom, com Diclorometano seco. A purga do solvente para a concentração foi feita com fluxo de Nitrogênio.

3.4.4. Elementos Químicos

As concentrações dos elementos químicos Antimônio, Arsênio, Bário, Berílio, Cádmio, Chumbo, Cobre, Cromo, Ferro, Manganês, Níquel, Prata, Selênio, Vanádio e Zinco foram determinadas por espectrometria por plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) de acordo com o método USEPA 6010C. O elemento químico Mercúrio foi quantificado usando a técnica analítica de espectrometria de absorção atômica (AAS) com vapor frio, conforme método USEPA 7471B, ambas realizadas em Laboratório externo à UFRJ.

3.5. Análises Biológicas

Foram realizadas análises microbiológicas dos micro-organismos através de quantificações de Bactérias Aeróbias Heterotróficas (BAE), Fungos Totais e Bactérias Anaeróbias Heterotróficas (BAN) que estão descritas a seguir.

3.5.1. Bactérias Aeróbias Heterotróficas (BAE)

A avaliação da concentração de BAE foi realizada através da técnica do Número Mais Provável (NMP) (HARRISON JR., 1982). Para tal, uma amostra inicial de solo (10g) foi adicionada a 100 mL de uma solução fisiológica (0,9% NaCl), e colocada sob agitação em mesa oscilatória termostaticada (TECNAL, TE-420) a 150 ± 1 RPM por 24 horas. Em seguida, a partir da suspensão foram preparadas subdiluições em solução fisiológica (0,9% NaCl), a fim de se obter fatores de diluição 1/10 a $10/10^8$ inoculadas em 9 mL de caldo nutriente cuja composição é apresentada na Tabela 2. Os tubos foram incubados a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 horas, e após este período o crescimento foi contabilizado pelo método do número mais provável (NMP) e os resultados expressos em Cels.g^{-1} de solo seco.

Tabela 2. Composição do meio Caldo Nutriente

Componentes	g.L ⁻¹
Peptona de Carne	10,0
Extrato de Carne (MERCK, 1.03979)	3,0
K ₂ HPO ₄ (VETEC, cód. 135)	1,0
NaCl (VETEC, cód. 466)	8,5

*pH= 7,0; esterilização a 0,5 atm por 20 min

Fonte: Silva, 2009

3.5.2. Fungos Totais

A quantificação de Fungos foi realizada pela técnica *pour plate* (APHA, 1992) em meio de cultura Sabouraud cuja composição é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Composição do meio Sabouraud

Componentes	g.L ⁻¹
Peptona de Carne (VETEC, cód. 5115)	10,0
Sacarose (VETEC, cód. 228)	3,0
Ágar (VETEC, 006)	20,0
NaCl (VETEC, cód. 466)	8,5

* pH = 6,0 ; Esterilização a 110°C por 20 minutos

Fonte: Silva, 2009

Assim sendo, uma amostra inicial de solo (10 g) foi adicionada a 100 mL de uma solução fisiológica (0,9% NaCl), e colocada sob agitação em mesa oscilatória termostaticada (TECNAL, TE-420) a 150±1 RPM por 24 horas. Em seguida, a partir da suspensão foram preparadas diluições em solução fisiológica (0,9% NaCl) variando de 10⁻¹ a 10⁻⁸ e de cada diluição alíquotas de 1mL foram transferidas para placas de *Petri* adicionando-se em seguida 20 mL do meio de cultura Sabouraud cuja composição é apresentada na Tabela 4. As placas foram incubadas a 37°C durante 7 dias, e os resultados expressos em UFC.g⁻¹ de solo seco.

3.5.3. Bactérias Anaeróbias Heterotróficas (BAN)

A contagem de Bactérias Anaeróbias Heterotróficas (BAN) foi realizada através da técnica do Número Mais Provável (NMP) (HARRISON JR., 1982), e os resultados expressos em Cels.g⁻¹ de solo seco. Para tanto, alíquotas de 1 mL da suspensão (10 g de solo/g de água destilada) foram distribuídas em frascos do tipo penicilina com capacidade para 10 mL contendo 9 mL de solução redutora cuja composição é apresentada na Tabela 4, de modo a obter fatores de diluição de 10⁻¹ a 10⁻⁸. Em seguida, uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi transferida para frascos do tipo penicilina contendo 9 mL de meio de cultura Fluido ao Tioglicolato purgado com N₂, cuja composição é apresentada na Tabela 5. Os frascos foram incubados por 15 dias a 37±1°C, e o crescimento avaliado visualmente pelo turvamento do meio.

Tabela 4. Composição da Solução Redutora

Componentes	Teor
Ácido ascórbico (MERCK, 1.00127.0100)	0,18 g.L ⁻¹
Tioglicolato de Sódio (MERCK, 1.08191)	0,124 g.L ⁻¹
Resazurina (VETEC, cód. 1277) **	4,0 mL.L ⁻¹
NaCl (VETEC, cód. 106)	8,5 g.L ⁻¹

* pH = 7,0 ; Esterilização a 121°C por 15 minutos;
 ** Solução de Resazurina na concentração de 0,025% (p/v)
Fonte: Silva, 2009

Tabela 5. Composição do meio Fluido ao Tioglicolato

Componentes	Teor
Glicose (MERCK, 8342)	5,0 g.L ⁻¹
Peptona	4,0 g.L ⁻¹
Extrato de Levedura (MERCK, 1.03753)	1,0 g.L ⁻¹
Resazurina (VETEC, cód. 1277)	4,0 mL.L ⁻¹
NaCl (VETEC, cód. 106)	8,5 g.L ⁻¹

* pH = 7,0 ; Esterilização a 110°C por 20 minutos
Fonte: Silva, 2009

CAPITULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do solo

As características físico-químicas dos solos são fatores determinantes na biodegradação de hidrocarbonetos, uma vez que afetam diretamente a atividade metabólica dos micro-organismos, pois está intimamente relacionada com a disponibilidade dos contaminantes. A Tabela 6 mostra os resultados da distribuição granulométrica do solo coletado para remediação em laboratório.

Tabela 6. Caracterização granulométrica do solo coletado

Parâmetro	Resultados (%)
Argila	4,07
Silte	2,37
Areia muito fina	3,66
Areia media	30,1
Areia fina	45,9
Areia grossa	13,0
Areia muito grossa	0,707
Areia Total	93,3

Em ambientes onde a biodegradação é o principal processo de diminuição da massa do contaminante, a granulometria do solo é considerado um dos parâmetros importantes no bioprocessos. NEDWELL & GRAY (1987) afirmam, por exemplo, que, solos com teores de argila próximos a 12%, podem manter os micro-organismos e substratos dentro do espaço dos poros, favorecendo a atividade enzimática. Por outro lado, solos com texturas muito finas ou porosidade muito alta, podem não veicular um suprimento de água adequado, prejudicando a ação dos micro-organismos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

No solo estudado, entretanto, há a predominância de partícula de areia, com predominância de areia fina, de menor porosidade, uma vez que solos arenosos apresentam poros com diâmetro maior do que 1 μm . Essa característica desse tipo de solo favorece a transferência de massa entre as fases sólida, líquida e gasosa do solo assim como os processos de transporte de matéria entre a atmosfera e o substrato sólido. Estes fatores permitem aumento da: 1- disponibilidade de nutrientes, 2- dos aceptores de eletros, especialmente, de oxigênio e, 3- da mistura entre micro-organismos e hidrocarbonetos, favorecendo desta forma a biodegradação (MARIN *et al.*, 2005).

A Tabela 7 apresenta os dados das concentrações de metais no solo contaminado.

Tabela 7. Metais detectados no solo contaminado

Parâmetro	Contaminado (mg.kg⁻¹)
Alumínio Total	88,8
Arsênio Total	10,4
Cádmio Total	107,8
Chumbo Total	107,6
Cobre Total	97,3
Cromo Total	102,9
Ferro Total	101,9
Manganês Total	103,2
Fósforo Total	104,0
Níquel Total	106,8
Prata Total	47,9
Selênio Total	9,87
Vanádio Total	101,3
Zinco Total	109,2

Sabe-se que muitos metais pesados são tóxicos aos micro-organismos, no entanto nas concentrações observadas não se espera efeito inibitório aos micro-organismos.

O solo em questão apresenta altas concentrações de Al, Fe e Mn, condizentes com os resultados da análise granulométrica já que os filossilicatos são compostos ricos em óxidos Al e Fe. Com base nos resultados analíticos da Tabela 7 pode-se ainda verificar altas concentrações de outros metais pesados, como por exemplo, Ni, Pb e Cd, que podem estar relacionadas à composição de *background* do solo local ou mesmo a contaminação com resíduos ou efluentes industriais.

Considerando que os solos podem, sem a interferência humana, conter metais pesados, o valor de *background* também é conhecido como Valor Orientador de Referência de Qualidade (VRQ). No Brasil, a necessidade de estabelecimento dos VRQ para as investigações ambientais está explícita na Resolução CONAMA N° 420, de 28 de dezembro de 2009. Em Angola, este tipo de legislação não existe, e por isso não pôde ser abordada neste trabalho.

O VRQ é baseado na avaliação dos teores naturais dos metais pesados nos solos, sem a influência de atividade humana. Para a definição do VRQ, a distribuição dos dados de uma população de amostras é normalizada e, em geral, se excluem dados anômalos da população. Esta normalização dos dados pode basear-se na exclusão em percentil (geralmente 90 e 95 percentil) e quartil superior (75 percentil) dos valores observados (CETESB, 2005), sendo esta a sugestão da Resolução CONAMA acima mencionada.

Dado que os metais pesados podem estar presentes nos solos de várias maneiras, por exemplo: forma iônica, hidratos e óxidos; o conhecimento da dinâmica de metais nos solos possibilita a utilização de práticas mitigadoras mais eficientes de forma a

gerenciar a disponibilidade destes elementos químicos à biota, e, por conseguinte, a sua toxicidade. Para determinar as formas com que os metais estão presentes no solo são requeridas análises mineralógicas e físico-químicas avançadas, e.g. especiação via ICP-MS (do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), que não foram executadas considerando os recursos disponíveis, a limitação de tempo e a complexidade inerente à especiação. A especiação de um elemento químico nos solos é controlada pela atividade iônica da solução, presença e concentração de outros íons ou outras moléculas com os quais formam complexos (Alleoni et al., 2005), potencial redox e pH do solo.

Além dos metais listados na Tabela 7, foi feita também a determinação de mercúrio total (USEPA 7471B), um metalóide de reconhecida toxicidade à maioria dos seres vivos. O teor de Nitrogênio também foi quantificado, dada a sua importância como macronutriente (OLIVEIRA, 2001). Os resultados das determinações de Hg e de N nos solos estão listados na Tabela 8. De acordo com os resultados obtidos, o solo estudado apresentou uma quantidade muito baixa de N e de Hg, que corrobora a hipótese da alta concentração de metais pesados estar relacionada ao *background* local ou contaminação por RSI ou efluente industrial.

Tabela 8. Quantidades de Mercúrio e Nitrogênio no solo contaminado

Parâmetro	mg.kg ⁻¹
Mercúrio Total	0,985
Nitrogênio	66,3

O baixo teor de N pode ser um fator limitante, especialmente quando o contaminante atua como fonte de carbono (RÖLING & VAN VERSEVELD, 2002), como no caso de solos impactados com óleo cru e derivados de petróleo.

No solo não contaminado, os teores de HTP e de cada HPA estavam abaixo do limite de quantificação, a saber, 40 mg.kg^{-1} e $0,5 \text{ mg do HPA.kg}^{-1}$, respectivamente.

O teor de HTP no solo contaminado amostrado em Angola foi de, aproximadamente, $21.500 \text{ mg.kg}^{-1}$, sendo quantificada uma mistura complexa não resolvida (MCNR) no cromatograma (Figura 5), de aproximadamente $14.000 \text{ mg.kg}^{-1}$. Este é um indicativo do intemperismo do óleo no solo estudado. O afastamento da linha de base do cromatograma corrobora a alegação do intemperismo.

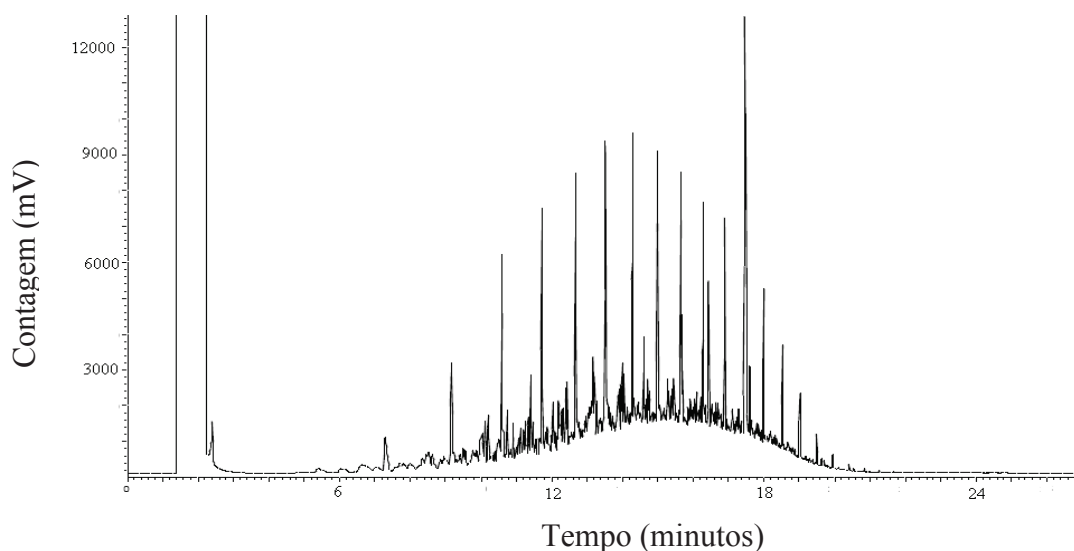


Figura 5. Cromatograma obtido do extrato do solo contaminado no início do experimento (zero hora)

Sabe-se que as estruturas químicas dos contaminantes influenciam diretamente a biodegradação destes compostos (DEL'ARCO, 1999; OLIVEIRA, 2001). Além disso, também é reportado na literatura que o intemperismo dos componentes do óleo incrementa a dificuldade da sua biodegradação. Trindade *et al.* (2005) definem intemperismo como o resultado de processos biológicos, químicos e físicos que podem afetar o tipo de hidrocarbonetos que permanecem no solo. Estes processos incrementam

a absorção de contaminantes orgânicos hidrofóbicos na matriz do solo, diminuindo a taxa e a extensão da biodegradação, por restarem, com o passar do tempo, os compostos cuja biodegradação é menos favorecida.

A análise da Figura 5 permite ainda verificar, a ausência de picos em dupletes, e que existe a predominância de HTP na faixa do óleo diesel, ou seja, HTP-DRO (*Diesel Range Organics, DRO = C₉ a C₂₈*), indicando se tratar de contaminação por óleo cru leve ou médio.

Na Tabela 9, estão apresentados os teores dos 16 HPA prioritários listados pelo USEPA, no solo impactado do local. No solo não contaminado, todos os teores apresentaram-se abaixo dos limites de quantificação.

Com base na Tabela 9, é possível notar que o solo possui contaminação por HPA, reconhecidos pela toxicidade e recalcitrância (VASCONCELOS *et al.*, 2011). Os HPAs com maiores concentrações são o Fenantreno e o Antraceno, em proporções de, aproximadamente 7:1 e 10:1, respectivamente, com relação aos demais HPA. O fenantreno é um HPA com três anéis aromáticos condensados, com K_{ow} alto, 4,6, e por estes motivos é considerado um HPA de baixa massa molecular (VASCONCELOS *et al.* 2011). A toxicidade dos HPA é bastante reportada na literatura (VASCONCELOS *et al.* 2011) e o Fenantreno é considerado um composto mutagênico, cuja genotoxicidade é limitada a alguns indivíduos (NETTO *et al.*, 2000). O seu caráter lipofílico permite que este composto possa ser absorvido pela pele, além de ser absorvido por ingestão ou por inalação, sendo rapidamente distribuído pelo organismo (NETTO *et al.*, 2000). Quanto ao Antraceno, os estudos de toxicidade não são suficientes para suportar a afirmação de caráter mutagênico e carcinogênico.

Tabela 9. Concentração dos 16 HPA prioritários da USEPA no solo contaminado

Parâmetro	HPA inicial (mg.kg ⁻¹)
Naftaleno	<1035
Acenaftileno	<1035
Acenafteno	<1035
Fluoreno	1200,5
Fenantreno	69958,0
Antraceno	102698,5
Fluoranteno	<1035
Pireno	15072
Benzo(a)antraceno	<1035
Criseno	18114,5
Benzo(b)fluoranteno	<1035
Benzo(K)fluoranteno	<1035
Benzo(a)pireno	<1035
Indeno(1,2,3-cd)pireno	<1035
Dibenzo(a,h)antraceno	<1035
Benzo(g,h,i)perileno	<1035

Considerando todo o conjunto de resultados até agora expostos, a biorremediação do solo em estudo é um processo complexo e envolve compostos que podem trazer danos à saúde humana, justificando as diferentes abordagens para o biotratamento propostas.

4.2. Biorremediação do solo contaminado *in natura*

Durante os testes foi observada uma variação de temperatura ambiente entre 19°C e 21°C segundo o Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE, 2011), que se encontra dentro da faixa considerada ótima para biodegradação de hidrocarbonetos.

A umidade permaneceu entre 15,12 a 17,51%. Disponibilizar adequados conteúdo de água aos solos compõe uma das ações primordiais à biorremediação, pois a água veicula nutrientes e micro-organismos, além de possibilitar a dispersão dos excretos celulares ao meio, favorecendo, dessa forma, a atividade da microbiota (ALEXANDER, 1999).

Em 90 dias de processo, a remoção do HTP foi de 62%, aproximadamente, que pode ser considerado uma redução boa, maiores valores não foram alcançados provavelmente devido à alta concentração dos contaminantes e toxicidade. A Figura 6 apresenta o cromatograma do extrato do solo ao final deste experimento.

A análise da Figura 6 permite evidenciar proeminente elevação da linha de base do cromatograma além de, ao se comparar com a Figura 5, se notar uma redução na quantidade dos picos definidos, que demonstram a degradação dos hidrocarbonetos alifáticos do contaminante. Cabe destacar que a faixa de tempo onde a maior parte dos picos eluem indica permanência de hidrocarbonetos na faixa do TPH-ORO (*Oil Range Organics, ORO = C₂₀ a C₄₀*), ou seja, na faixa dos lubrificantes. Desta forma, fica clara a remanescência de compostos de maior massa molecular.

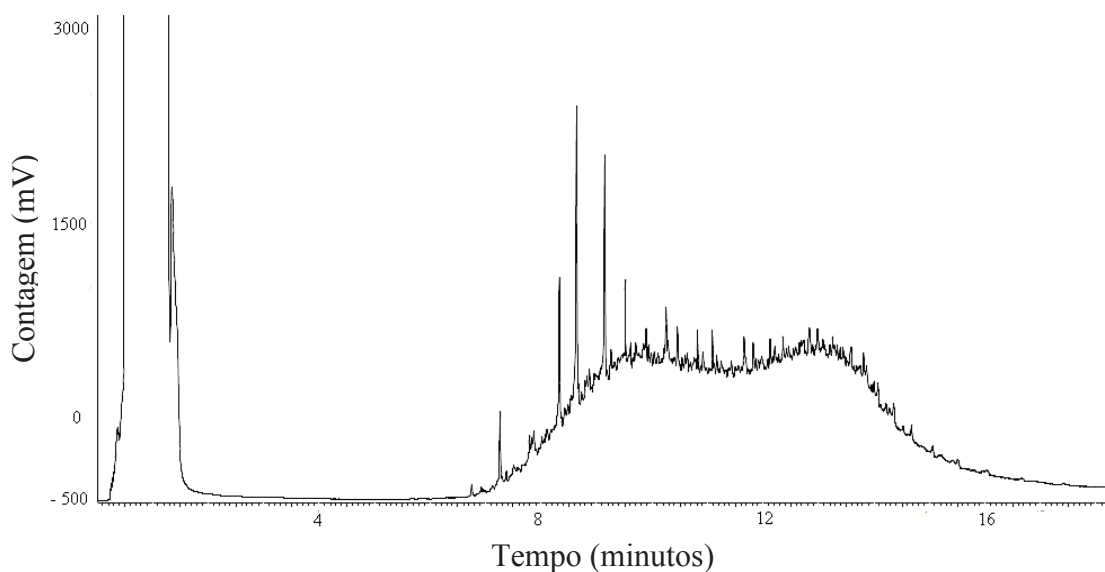


Figura 6. Cromatograma obtido do extrato do solo *in natura* no final do experimento de biorremediação

A mistura complexa não resolvida (MCNR) passou a representar 1/3 do HTP total do solo e, juntamente com a ausência de pristano e fitano, reforçam a hipótese de biodegradação.

A remoção dos 16 HPA monitorados foi de, aproximadamente 16%, assim pode-se deduzir que houve remoção preferencial dos hidrocarbonetos alifáticos em relação aos aromáticos, corroborando os resultados de Oliveira e de França (2005) e de Vasconcelos *et al.* (2011) que trabalharam com alternativas de bioestímulo na degradação de hidrocarbonetos de petróleo.

Para suportar as alegações de biodegradação dos compostos orgânicos, foram monitoradas as concentrações de bactérias e fungos no solo, conforme Figura 7 a 9.

Pode-se verificar nas Figuras 7 e 8 que a concentração de bactérias aeróbias e anaeróbias cresceu até o período de 45 dias, quando se identificou a maior concentração de bactérias, permanecendo na faixa de 10^{11} Cels.g⁻¹, até 90 dias de processo. Assim, dado o processo de revolvimento e aeração, juntamente com os resultados da granulometria do solo, pode-se inferir que as bactérias quantificadas como anaeróbias podem ser, na realidade, facultativas, pois foram capazes de sobreviver nas condições de aerobiose aplicadas.

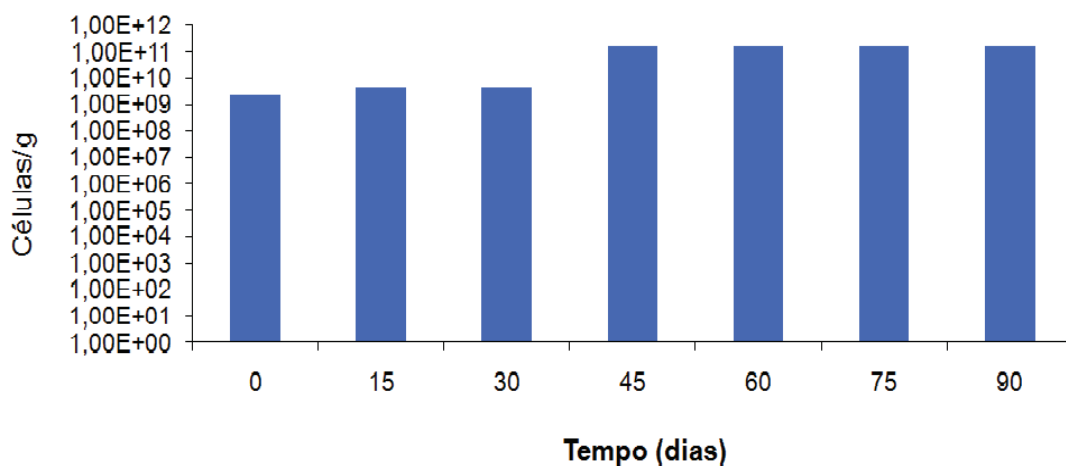


Figura 7. Evolução Bactérias Aeróbias Heterotróficas Totais durante a Biorremediação do solo contaminado, *in natura*

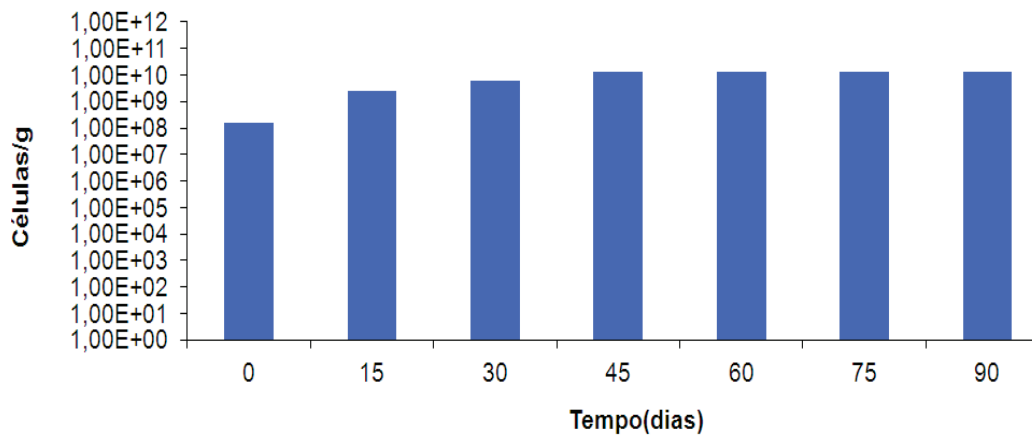


Figura 8. Evolução Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais durante a Biorremediação do solo contaminado, *in natura*

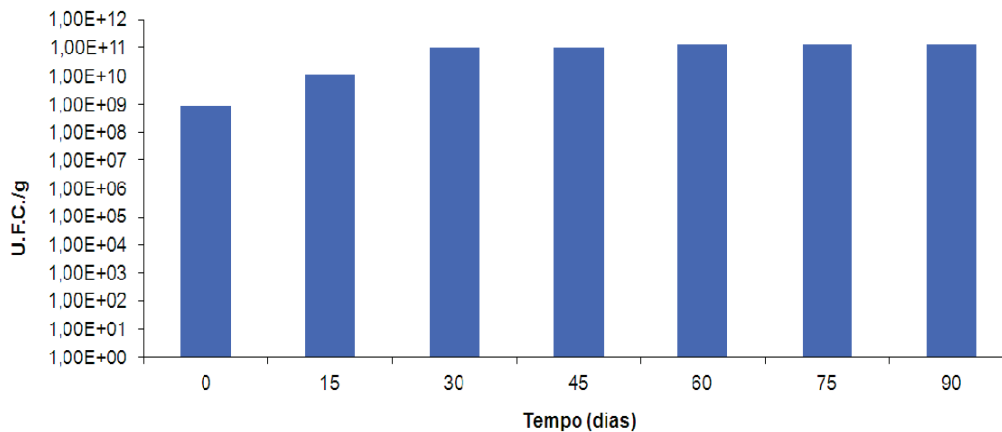


Figura 9. Evolução de Fungos Totais durante a Biorremediação do solo contaminado, *in natura*.

OLIVEIRA (2001) reporta que tanto bactérias aeróbias quanto as anaeróbias ou as facultativas são capazes de degradar hidrocarbonetos. No entanto, o processo de degradação desta fonte de carbono difere para cada um destes grupos, sendo as linhagens aeróbias mais ágeis, dado o metabolismo que usa o oxigênio como acceptor final de elétrons e a maior produção de biomassa que, por ser descendente, está mais adaptada, e mais hábil na biodegradação que seus predecessores.

Na Figura 9 é possível verificar que a concentração de fungos totais cresceu até o período de 30 dias, quando se identificou a maior concentração de fungos, permanecendo na faixa de 10^{11} U.F.C.g⁻¹, até 90 dias de processo.

A Figura 10 revela o aspecto de preparações coradas pelo método de Gram de uma suspensão do solo, num aumento de mil vezes. Pode-se visualizar a abundância de grupos microbianos no solo em estudo. Dentre tais grupos microbianos é possível observar a presença de bastonetes Gram-positivos predominantemente, indicando, mais uma vez, que a remoção pode ter sido majoritariamente executada por micro-organismos.

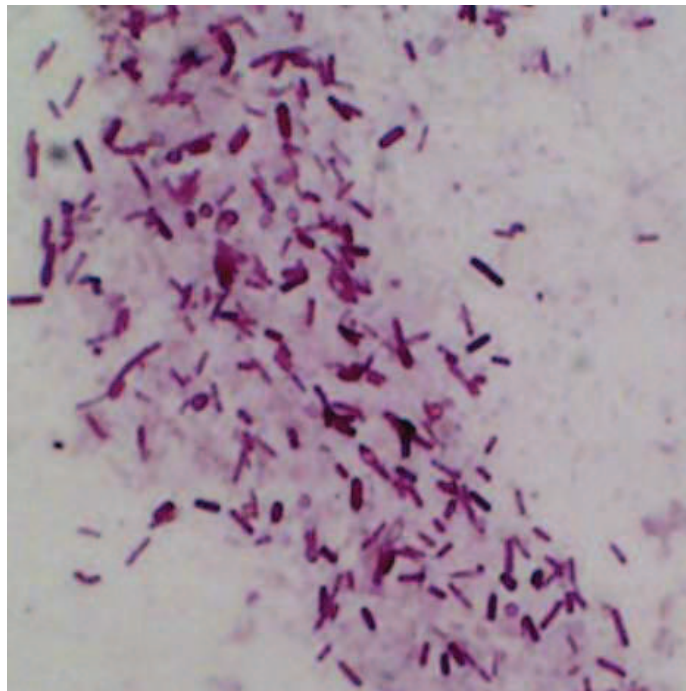


Figura 10. Aspecto microscópico das células de micro-organismos crescidas durante os experimentos (coloração pelo método de Gram; aumento 1000x)

Semelhante ao acontecido com as bactérias, a concentração de fungos também cresceu após início dos testes. No entanto, alcançou-se o valor máximo em 30 dias de processo, permanecendo na faixa de 10^{12} U.F.C.g⁻¹ até 90 dias de processo.

A Figura 11 apresenta o aspecto macroscópico dos crescimentos dos Fungos crescidos em Gelose Sabouraud em placas de Petri por tempo de tratamento de 60 dias. As alíquotas de solos foram tomadas em 60 dias e pode-se observar a abundância de fungos e de esporos de cor marrom. Fungos compreendem uma classe de microorganismos bastante importante na biodegradação de compostos recalcitrantes (SUTHERLAND, 1992).

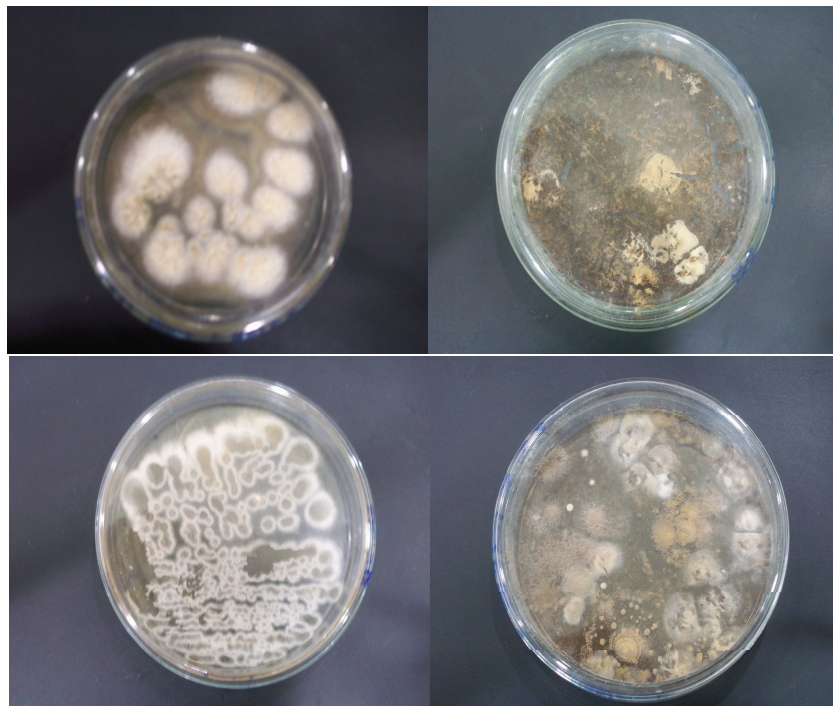


Figura 11. Aspecto macroscópico dos crescimentos dos Fungos crescidos em Gelose Sabouraud, a partir dos experimentos com 60 dias de processo.

MPHEKGO & CLOETE (2004) reportam que a população e a diversidade da microbiota são informações importantes para avaliar o potencial de biorremediação de um solo, assim, com base nos resultados obtidos até o momento, acredita-se no potencial do bioprocessamento para remediação do solo estudado, impulsionando, assim, a busca de outras alternativas de processo para a melhoria da biorremediação.

4.3. Experimentos de Biorremediação de misturas de solo contaminado e não contaminado

Durante os testes foi observada uma variação de temperatura entre 20°C e 21°C (INPE, 2011), para a temperatura ambiente que foi assumida como idêntica a do solo dada a sua granulometria e o tempo dos experimentos. A pequena variação de temperatura justifica em função do fato da realização dos testes ter ocorrido na estação da primavera, sem a incidência de passagem de frentes frias na cidade do Rio de Janeiro. O processo de degradação não foi dificultado, em função da atividade metabólica dos micro-organismos mesófilos (MOHAMED *et al.*, 2006).

A umidade dos solos nos reatores foi mantida numa faixa entre 14,02 a 16,37% e o processo de correção da umidade garantiu o fornecimento de água à microbiota. Esta faixa de umidade estava inserida na faixa ideal de biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo, isto é, de 15-20% (KOTER; WHITE & KELSEY, 2001).

A Figura 12 apresenta a evolução do pH e da remoção dos HTP durante os 90 dias de processo. Foi assumido que no início, tempo zero, a remoção foi desprezível.

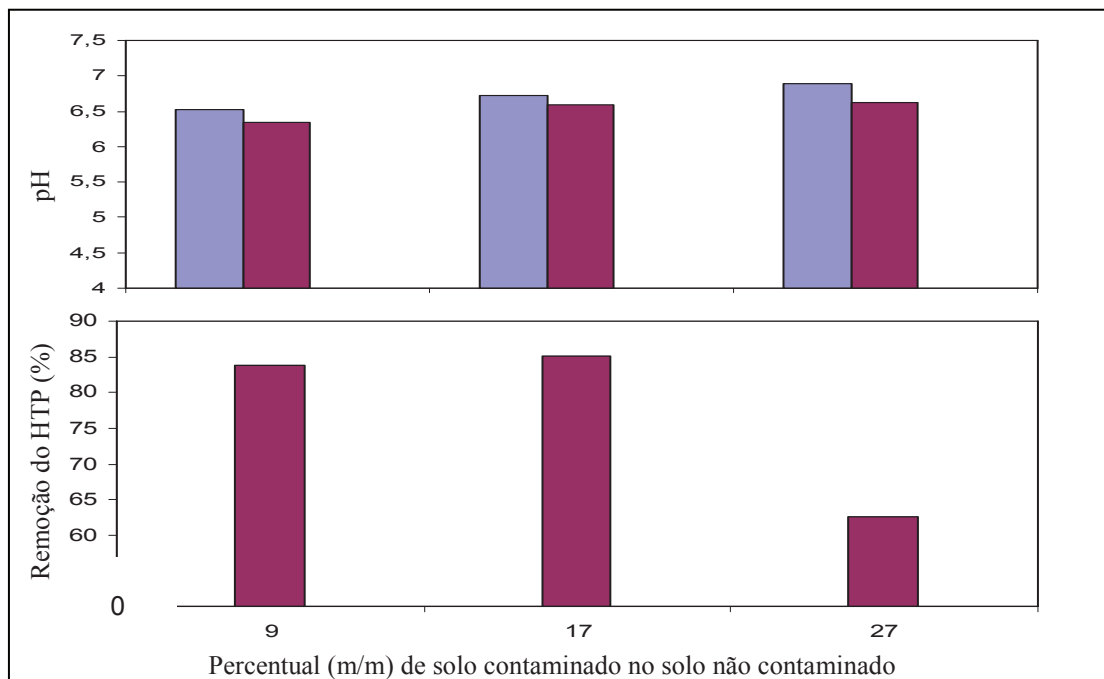


Figura 12. Valores de pH e biodegradação dos Hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) em 0 dias e 90 dias

Nota-se que o pH dos solos esteve ao longo do processo dentro da faixa entre 6,0 e 8,0, considerada favorável ao seu crescimento quando a biodegradação tende a ser mais rápida (ATLAS, 1989; ALEXANDER, 1999), porém permanecendo na faixa levemente ácida à neutra, que é considerada como ótimo para este tipo de bioprocessos (FRANÇA *et al.*, 2004). A oxidação microbiana das frações leves e pesadas do óleo produzem diversos tipos de ácidos orgânicos, principalmente aqueles derivados de hidrocarbonetos leves, que reduzem o pH do solo e revelam evidências de uma microbiota metabolicamente ativa (WATSON *et al.*, 2002).

Verifica-se, ainda, que, no período monitorado, a biodegradação dos hidrocarbonetos variou entre 62 e 88%, sendo os valores máximos encontrados nos testes conduzidos nas relações de 9 e 17% de massa de solo contaminado e solo não contaminado.

No entanto, é importante salientar que, as concentrações iniciais de HTP nos reatores cresceram com o aumento da massa de solo contaminado incorporada. Assim, a remoção de HTP em massa por kg de solo, foi maior nos testes conduzidos na proporção de 27%. De forma geral, a massa de HTP removida foi proporcional à concentração inicial de HTP na faixa de concentrações estudadas.

Elliott & Elliott (2007), afirmam que altas concentrações de substrato saturam as enzimas limitando a atividade catalítica e conseqüentemente limitando a degradação. Assim, acredita-se que nas condições de 9, 17 e 27% de massa de solo contaminado em relação ao solo não contaminado não se alcançou concentrações de hidrocarbonetos tóxicas às células.

A Figura 13 apresenta o cromatograma do extrato orgânico do solo nos testes de biorremediação conduzidos na mistura a 17% de relação entre a massa de solo contaminado e não contaminado. Pode-se verificar a ausência quase que completa de

picos definidos, indicando a biodegradação quase total dos hidrocarbonetos alifáticos na faixa $n\text{-C}_{10}$ a $n\text{-C}_{36}$, monitorada.

O perfil cromatográfico indica ainda a remanescência de hidrocarbonetos na faixa dos lubrificantes, ou seja, aqueles de maior massa molecular, corroborando as alegações de Alexander (1999) que reporta que estes compostos têm sua biodegradação preterida quando comparada aos compostos de baixa e média massa molecular, dado aos critérios de solubilidade em água, determinantes para a biodisponibilidade, e consequentemente a biodegradação.

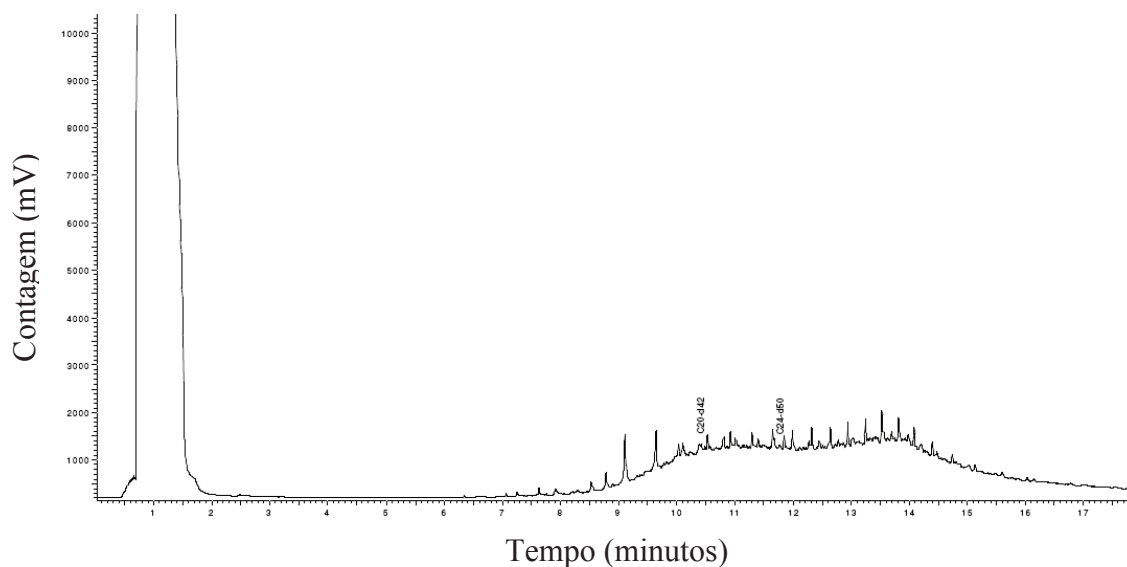


Figura 13. Cromatograma obtido do extrato do solo com 90 dias de processo, usando-se 17% de solo contaminado em relação a solo não contaminado.

Os perfis de crescimento dos grupos microbianos monitorados estão apresentados nas Figuras 14 a 16.

A análise do perfil de concentração das BAE, Figura 14, permite verificar que este grupo microbiano apresentou o seu ponto de concentração máxima em, aproximadamente, 30 e 45 dias de processo, de aproximadamente, 10^{10} Cels.g⁻¹ de solo, independente da concentração inicial de hidrocarbonetos. Durante os 90 dias de

monitoramento, foi verificado que, somente, no teste conduzido na proporção de 17% houve redução da concentração de bactérias aeróbias heterotróficas. Este comportamento pode estar relacionado com desvios nas medições ou redução da disponibilidade da fonte de carbono neste reator, dada os resultados de máxima biodegradação já apresentados.

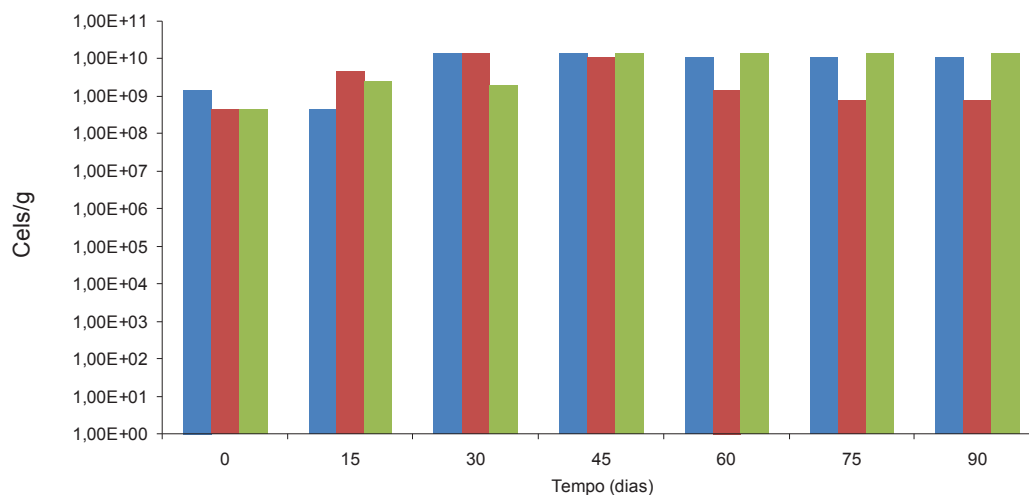


Figura 14. Evolução das concentrações de bactérias aeróbias heterotróficas nos experimentos contendo diferentes teores de solo contaminado (■ 9%, ■ 17% e ■ 27%)

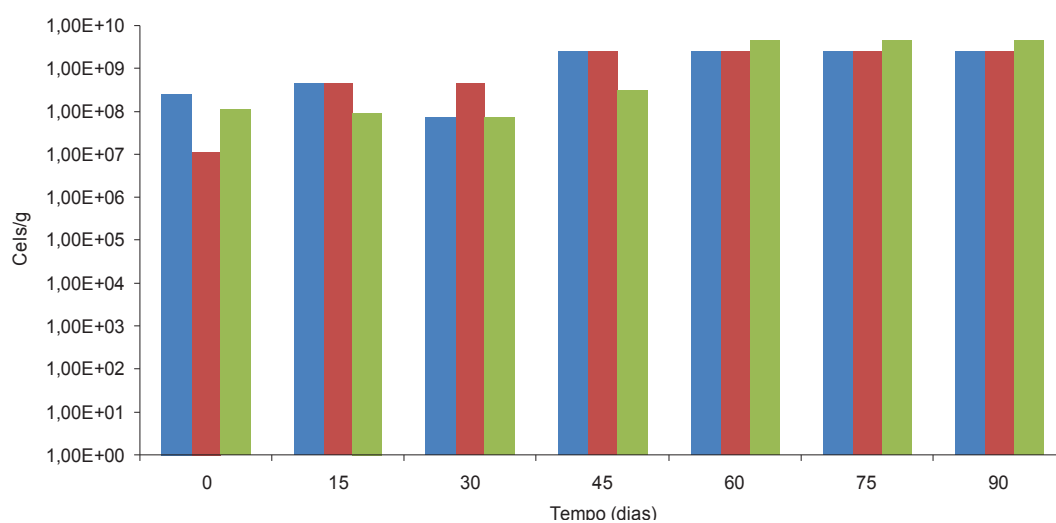


Figura 15. Evolução das concentrações de bactérias anaeróbias heterotróficas nos experimentos contendo diferentes teores de solo contaminado (■ 9%, ■ 17% e ■ 27%)

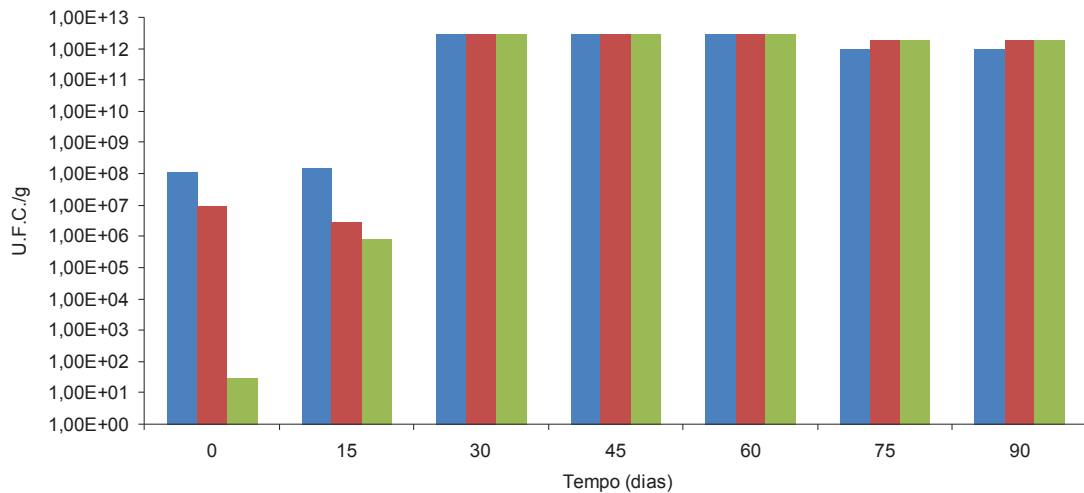


Figura 16. Evolução das concentrações de fungos nos experimentos contendo diferentes teores de solo contaminado (■ 9%, ■ 17% e ■ 27%)

Cabe destacar que, os reatores passaram pela técnica de bioaumentação e, para tanto, foi utilizada como fonte de micro-organismo a água da Baía de Guanabara - um recurso natural com histórico de contaminação por petróleo e derivados de petróleo e que pode conter linhagens bacterianas adaptadas a esta classe de contaminantes (OLIVEIRA, 2001).

A análise do perfil de concentração das BAN, Figura 15, permite verificar que a população de BAE apresentou o seu ponto de máximo em, aproximadamente, 60 dias de processo, aproximadamente, 10^9 Cels.g⁻¹ de solo. Isto foi observado independente da concentração inicial de hidrocarbonetos. Durante os 90 dias de monitoramento não foram verificadas alterações na concentração de bactérias anaeróbias heterotróficas. Este comportamento foi interpretado como efeito do bioaumentação com microbiota adaptada aos contaminantes.

Os Fungos tiveram a máxima taxa de crescimento em 30 dias de processo, quando a concentração deste grupo de micro-organismos aumentou significativamente em 15 dias, não sendo observadas alterações nos valores de concentração após este período de tempo, e a concentração permaneceu na ordem de 10^{12} U.F.C.g⁻¹.

A capacidade dos fungos, especialmente dos fungos filamentosos em biodegradar contaminantes orgânicos é bastante reconhecida na literatura, utilizada ao longo do tempo em processos de tratamento biológico de efluentes líquidos e de resíduo sólidos (SHUTERLAND, 1992; COLLA *et al.*, 2008). Considerando este potencial, pode-se relacionar os resultados de biodegradação encontrados com a alta população de fungos metabolicamente ativos. Cabe destacar ainda, que em estudos recentes realizados, as concentrações máximas de fungos nos solos são, aproximadamente, 10^5 U.F.C.g⁻¹. Sabe-se que a biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos não é somente influenciada pela quantidade de micro-organismos, mas, sobretudo, pela habilidade das linhagens em biodegradar estes contaminantes. O aumento na concentração de fungos observado é indicativo de alto potencial de biodegradação, especialmente de HPA (ATAGANA, 2004), e apontam para a necessidade de investigar a biodiversidade destes solos.

De fato, a concentração dos HPAs nos solos dos reatores que operaram com 9, 17 e 27% (m/m) de solo contaminado em relação ao solo não contaminado apresentaram teores de HPA abaixo do limite de detecção, $17 \mu\text{g.kg}^{-1}$, indicando que a taxa de remoção para o Antraceno e o Fenantreno, em 90 dias, foram, respectivamente, de 1,1 e $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$.

Sayles *et al.* (1999) avaliaram a degradação de HPA em *landfarming* em escala piloto. A concentração de HPA total variou de 2.800 mg.kg^{-1} (início) para 1.160 mg.kg^{-1} (final) em 175 dias, equivalente a uma produtividade de $9,37 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. A avaliação toxicológica feita pelos autores indicou significativa redução do caráter carcinogênico e mutagênico no solo tratado. Por outro lado Picado *et al.* (2001) estudaram o tratamento de resíduo de coque pelo processo de *landfarming* contendo alta concentração de HPA (1.140 mg.kg^{-1}), e após 3 meses obtiveram 63% de degradação, sendo mais acentuada

para os compostos com 2 e 3 anéis benzênicos. Atagana (2004) viabilizou o tratamento de solo contaminado com creosoto (derivado do processamento do alcatrão de hulha) pelo processo de *landfarming* numa área contendo alta concentração de HPA (1.229,9 mg.kg⁻¹), e após um período de 10 meses observou a redução de HPA para 92,4 mg.kg⁻¹, equivalente a uma taxa de 3,79 mg.kg⁻¹.dia⁻¹, sendo mais acentuada para HPA contendo 2 e 3 anéis benzênicos, embora os compostos com 4 e 5 anéis foram 81,5% degradados. Finalmente Silva (2009) avaliou o tratamento de resíduos oleosos pelo processamento de *landfarming* e o teor de HTP decresceu 89,6% no solo tratado com uma produtividade média de degradação de 25,8 mg.kg⁻¹.dia⁻¹, enquanto que o solo controle apresentou 22,4% de degradação (6,5 mg.kg⁻¹.dia⁻¹) e a concentração de HPA reduziu em 88,7% (0,13 mg.kg⁻¹.dia⁻¹).

Assim, os resultados encontrados de remoção de HPA são comparáveis aos reportados na literatura, e indicam os excelentes desempenhos das estratégias de biorremediação aqui propostas para o solo e contaminante estudado.

CAPITULO 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

A análise dos resultados obtidos para ambos os experimentos permite chegar a algumas conclusões, abaixo listadas:

- O emprego do tratamento por biorremediação, usando a técnica de bioaumento, foi eficiente para remoção de hidrocarbonetos no solo.
- O solo contaminado, na forma em que foi coletado, também aqui denominado *in natura*, teve remoção de 62% dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), nas condições experimentais utilizadas, remanescendo compostos na faixa de lubrificantes, mais recalcitrantes, provavelmente devido à alta concentração destes contaminantes.
- Quando se trabalhou com misturas de solo contaminado e solo não contaminado, verificou-se que a redução da quantidade de HTP nos solos foi proporcional a quantidade de HTP no início dos testes.
- Nos testes executados com o solo contaminado *in natura* houve remoção de, aproximadamente, 16% na concentração total dos 16 HPA monitorados.
- Nas condições experimentais de mistura entre solo contaminado e solo não contaminado a 9, 17 e a 27% houve 100% de remoção dos 16 HPA monitorados.

-
- Os bioaumentos realizados podem ter causado o aumento na quantidade de células microbianas capazes de biodegradar hidrocarbonetos nos solos, que em consórcio com a microbiota nativa, pode ter favorecido a remoção dos compostos orgânicos do petróleo.
 - Considerando o tempo de tratamento e a concentração inicial dos contaminantes pode-se dizer que os resultados foram promissores. Os teores de HTP e HPA obtidos do solo estiveram abaixo dos limites de intervenção preconizados pela Legislação Brasileira, uma das mais restritivas do mundo. Entretanto, apesar de se ter obtido, ao longo do processo, resultados satisfatórios, não é possível afirmar que as concentrações remanescentes dos contaminantes não são tóxicas, por não terem sido feitos testes eco-toxicológicos.

5.2 Sugestões

Abaixo, encontra-se uma lista de sugestões para experimentos futuros, a fim de incrementar o entendimento do tema abordado nesta dissertação:

- Realizar ensaios para verificar a toxicidade dos solos biorremediados.
- Realizar testes sem adição de microbiota exógena, para verificar o potencial da microbiota nativa do solo Angolano na biodegradação de hidrocarbonetos.
- Identificar as variações das populações das linhagens predominantes de fungos e bactérias presentes no solo estudado.
- Realizar testes de bioestímulo com fontes alternativas de N e P, de baixo custo, considerando o mercado Angolano.

CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISLABIE, J., SAUL, D. J. and FOGHT, J. M. 2006. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles*. 10,pp. 171–179.

ALEXANDER, M., 1999, Biodegradation and bioremediation. California, *Academic Press*. Inc.

ALLARD, A. S. & NEILSON, A. H. 1997. Bioremediation of organic waste sites: a critical review of microbiological aspects. *International biodeterioration & biodegradation*. 39, pp. 253–285.

ALLEONI, L.R.F.; IGLESIAS, C.S.M.; MELLO, S.C.; CAMARGO, O.A.; CASAGRANDE, J.C.; LAVORENTI, N.A. 2005. Atributos do solo relacionados à adsorção de cádmio e cobre em solos tropicais. *Acta Scientiarum Agronomy*, v.27, pp. 729-737.

ANSELMO, A L F, JONES, C. M. 2005 Fitorremediação de Solos Contaminados – O Estado da Arte. *XXV Encontro Nacional de Engenharia de Produção*, Porto Alegre, RS, Brasil.

ATAGANA, H.I., 2004, “Bioremediation of creosote-contaminated soil in South Africa by landfarming”, *Journal of Applied Microbiology*, v.96, pp. 510-520.

ATLAS, R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiology Review* 45(1), pp. 180–209.

ATLAS, R. M. 1991. Microbial hydrocarbon degradation—bioremediation of oil spills. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 52, pp. 149–156.

APHA (American Public Health Association), 1992, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 18 ed., Maryland, USA.

BALKS, M. R., PAETZOLD, R. F., KIMBLE, J. M., AISLABIE, J. & CAMPBELL, I. B. 2002. Effects of hydrocarbon spills on the temperature and moisture regimes of cryosols in the Ross Sea region. *Antarctic Science*. 14(4): pp. 319–326.

BAPTISTA, S.J. Avaliação do Emprego de Biossurfactante na Biorremediação de Solos Contaminados com Óleo Diesel. *Tese de doutorado*. EQ/UFRJ. Rio de Janeiro. 146. 2007.

BELSER, L. W.: Population ecology of nitrifying bacteria. *Annual Review Microbiol.*, 33, pp. 309-333 (1979).

BOOPATHY, R., 2000, Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource technology*, v74, pp.63-67.

BRADFORD, M.L. & KRISHNAMOORTHY, R. 1992. Consider bioremediation for waste site cleanup. *Chemical Engineering Progress* (2).87p.

BRESSLER, D. C. & GRAY, M. R. 2003. Transport and reaction processes in bioremediation of organic contaminants. 1. Review of bacterial degradation and transport. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. 1: R3.

BUDAVARI, S. The merk index: na encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 1996. *Whitehouse Station*, NJ: Merck;

CASTRO, Í. B., MEIRELLES, C. A., MATTHEWS-CASCON, HELENA, FERNANDEZ, MARCOS, A. 2004. *Thais* (Stramonita) *rustica* (Lamarck, 1822) (Mollusca: Gastropoda: Thaididae), a potential bioindicator of contamination by organotin Northeast Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, São Paulo: v. 52, n. 2, p. 51– 55.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB, 2005. DECISÃO DE DIRETORIA Nº 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005.

CHAPELLE, F.H. (2000). *Ground-water microbiology and geochemistry*. Ed. New York, John Wiley and Sons *apud* MARTINS, A.; DINARDI, A.L.; FORMAGI, V.M.; LOPES, T.A.; BARROS, R.M.; CONEGLIAN, C.M.R.; BRITO, N. N.; SOBRINHO, G.D.; TONSO, S.; PELEGRINI, R. (2003) Biorremediação. III Fórum de Estudos Contábeis, *Faculdades Integradas Claretianas*, Rio Claro, SP.

COLLA, L. M, PRIMAZ, A. L., LIMA, M., BERTOLIN, T. E., COSTA, J. A. V. 2008. Isolation and screening of fungi to bioremediation from triazine herbicide contaminated soil. *Ciências Agrotecnológicas*, Lavras, 32-3, pp.809-813.

COOKSON, J.T., Jr 1995. *Bioremediation Engineering: Design and Application*, *McGraw-Hill*, New York.

CORRER, C. J., MAZZOCHIN L. F., Lobo, I., SAAB O. J. G. A., GUEDES, C. L. B.

2007. Aplicação in situ de surfactantes em solo contaminado com petróleo e tratamento da água residual com agente oxidante. *PDPetro* (4), pp. 21-24.

CUTRIGHT, T.J., FULLERTON, K.L., GOGATE, M.R. & LEE, S. 1991. Contaminated soil cleanup, *AIChE Summer National Meeting*, Pittsburgh, PA, Aug. pp.18-21.

D'ANNIBALE, A., ROSETTO, F. LEONARDI, V., FEDERICI, F., & PETRUCCIOLI, M. 2006. Role of Autochthonous Filamentous Fungi in Bioremediation of a Soil. Historically Contaminated with Aromatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* (72), 1: 28–36.

DE PAULA, A M., SOARES, C. R. F. S. & SIQUEIRA, J.O. Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de “landfarming” de resíduos petroquímicos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* (10), 2: p.448–455, 2006.

DIAMOND, Jared M. Colapso. 4ª Edição. Rio de Janeiro: Record, 2006.

ELLIOTT, W. H. & ELLIOTT, D.C. 2005. Biochemistry and Molecular Biology. *Oxford*, third edition. 581p.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro: SNLCS, 1979.

ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION, 2011. Country Analysis Briefs. Angola. pp.1-8. Disponível em: <http://www.eia.gov/countries/cab.cfm?fips=AO> ; Pesquisado em : Dezembro de 2011.

FIGUEIREDO, J. 2009. Derrame de petróleo priva população do consumo de água no rio Nzombo. *Jornal de Angola*. Disponível em: http://jornaldeangola.sapo.ao/18/0/derrame_de_petroleo_priva_populacao_do_consumo_de_agua_do_rio_nzombo; Pesquisado em : Dezembro de 2011.

FIGUEIREDO, J. 2011. Praias do Soyo sujas com crude. *Jornal de Angola*. Disponível em: http://jornaldeangola.sapo.ao/18/0/praias_do_soyo_sujas_com_crude; Pesquisado em: Dezembro de 2011.

FILLER, D. M., REYNOLDS, C. M., SNAPE, I., DAUGULIS, A. J., BARNES, D. L. and WILLIAMS, P. J. 2006. Advances in engineered remediation for use in the Arctic and Antarctica. *Polar Rec.* 42, pp.111–120.

FINEGOLD, L. 1996. Molecular and biophysical aspects of adaptation of life to temperatures below the freezing point. *Adv. Space Res.* 18(12), pp.87–95.

FONDO MONETARIO INTERNACIONAL, 2010. Perspectivas de la economía mundial. Recuperación, riesgo e reequilibrio. Estudios económicos y financieros. p.191; Disponível em: <http://www.imf.org/external/spanish/pubs/ft/weo/2010/02/pdf/texts.pdf>; Pesquisado em: Dezembro de 2011.

GILICHINSKY, D. A., SOINA, V. S. & PETROVA, M. A. 1993. Cryoprotective properties of water in the Earth cryolithosphere and its role in exobiology. *Orig. Life Evol. Biosph.* 23(1), pp. 65–75.

HAMDI H., BENZARTI S., MANUSADŽIANAS L., AOYAMA I., JEDIDI N. 2007. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biol Biochem.*(39).pp.1926-35.

HARAYAMA,S.1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Curr Opin Biotechnol*, (8), pp.268-273.

HARMSSEN, J. 2004. Landfarming of polycyclic aromatic hydrocarbons and mineral oil contaminated sediments. PhD. Thesis, *Wageningen University*, Wageningen.

HICKS, B.N. & CAPLAN, J.A. 1993. Bioremediation: a natural solution. *Pollution Eng.* 25(2). pp.30-33.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS, 2011. Disponível em: clima1.cptec.inpe.br/~rclima1/monitoramento_brasil.shtml

IWAMOTO, T. & NASU, M.2001. Current Bioremediation Practice and Perspective. *Journal of bioscience and bioengineering.* 92(1), pp.1-8.

JENKINS, T. F., JOHNSON, L. A., COLLINS, C. M. & MCFADDEN, T. T. 1978. The physical, chemical and biological effects of crude oil spills on black spruce forest, interior Alaska. *Arctic.* 31(3), pp.305–323.

JONES, H. G., POMEROY, J. W., WALKER, D. A. and HOHAM, R. W. (eds). 2003.

Snow Ecology, an Interdisciplinary Examination of Snow-Covered Ecosystem. *Ocean Press*, Beijing.

KARL, D. M. 1992. The grounding of the Bahia Paraiso: microbial ecology of the 1989 Antarctic oil spill. *Microbial Ecol.* 24. pp.77–89.

KANALY R.A., BARTHA,R., HARAYAMA,S.2000. Biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol* 182.pp.2059-2067.

KERRY, E. 1993. Bioremediation of experimental petroleum spills on mineral soils in the Vestfold Hills, Antarctica. *Polar Biol.* 13: pp.163–170.

KHAN, F.I., HUSAIN, T.; HEJAZI, R.(2004) An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management*, 71.pp.95-122.

KROPP, K. G. & FEDORAK, P. M. 1998. A review of the occurrence, toxicity, and biodegradation of condensed thiophenes found in petroleum. *Can. J. Microbiol.* 44(7): pp.605–622.

LEVIN, M.A. & GEALT, M.A.(eds)1993. Biotreatment of Industrial and Hazardous waste, *McGrawHill*, New York.

LOVLEI, D. R./ Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction.1991. *Microbiol. Rev.*, 55, pp. 259-287.

MAGZU, D.M. & CARBERRY, J.1989. Biodegradation of petroleum contaminants in soil. In Hazardous and Industrial Waste: *Proceedings of 21st Mid-Atlantic Industrial Waste conference*.pp.207-212.

MARGESIN, R. & SCHINNER, F. 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, pp. 650–663.

MARIN, J.A., HERNANDEZ, T., GARCIA, C., 2005, “Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity”, *Environmental Research*, (98), pp. 185-195.

MARTINS, A.; DINARDI, A.L.; FORMAGI, V.M.; LOPES, T.A.; BARROS, R.M.; CONEGLIAN, C.M.R.; BRITO,N.N.; SOBRINHO, G.D.; TONSO, S.; PELEGRINI, R.2003. Biorremediação. *III Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas*, Rio Claro, SP.

MCFARLAND, M. J. & SIMS, R. C. 1991. Thermodynamic framework for evaluating PAH degradation in the subsurface. *Ground Water*. 29(6), pp.885–896.

MILLS, C.H.1995. Bioremediation comes of age. *Civil Engeneering* (65), pp.80-81.

MINISTÉRIO DAS FINANÇAS DA REPÚBLICA DE ANGOLA. 2008. Boletim Anual de Estatísticas do Orçamento Geral do Estado de 2007. Luanda, Angola. pp.1-75.

MOHAMED, M. E.; AL-DOUSARY, M.; HAMZAH, R. Y.; FUCHS, G. 2006. Isolation and characterization of indigenous thermophilic bacteria active in natural attenuation of biohazardous petrochemical pollutants. *Int Biodeterior Biodegradation. Barking*. v. 58, n. 3-4, pp.213-223,

MOLINA-BARAHONA, L., RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R., HERNÁNDEZ-VELASCO, M., VEGA-JARQUÍN C., ZAPATA-PÉREZ, O., MENDOZA-CANTÚ, A., ALBORES, A. 2004. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. *Applied oil Ecology*, 27: pp.165-175.

MONETARY INTERNATIONAL FUND, 2011. ANGOLA: Fourth Review Under the Stand-By Arrangement, Request for Waivers of Nonobservance of Performance Criteria, Request for Waivers of Applicability of Performance Criteria, and Request for Modification of Performance Criteria. 62p.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: Ed. UFLA, 2002. 625p.

MPHEHGO, P.M., CLOETE, T.E., 2004, “Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages?” *Environmental Science & Bio/Technology*,(3), pp.349-360.

NADELHOFER, K. J., GIBLIN, A. E., SHAVER, G. R. & LINKENS, A. E. 1992. Microbial processes and plant nutrient availability in arctic soils. In Chapin, F. S. III., Jeffries, R. L., Reynolds, J. F., Shaver, G. R., and Svoboda, J. (eds.) *Arctic Ecosystems in a Changing Climate: An Ecophysiological Perspective*. *Academic Press*, San Diego. pp.281–300.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2000. Natural attenuation for groundwater remediation. *National Academy of Sciences*, Washington, 274p.

NEDWELL, D.B. & GRAY, T.R.G. 1987. Soil and sediment as matrices for microbial growth. In: *Ecological of Microbial Communities*. *Cambridge University Press*, U.K, pp.21-54.

NORRIS, R.D., HINCHEE, R.E., BROWN, R., McCARTY, P.L., SEMPRINI, L., WILSON, J.T., KAMPBELL, D.H., REINHARD, M., BOUWER, E.J., BORDEN, R.C., VOGEL, T., THOMAS, J.M. & WARD, C.H. 1994. *Handbook of Biorremediation*, *Lewis Publishers*, Boca Raton.

OLIVEIRA, F.J.S., DE FRANÇA, F.P., 2004, “The use of biostimulation and intrinsic bioremediation for crude-oil contaminated sandy soil treatment”, *solos e Rochas-Revista Brasileira de Geotecnia*, v. 27, n.3, pp.287-292.

OLIVEIRA, F. J. S. 2001, Biorremediação de solo arenoso contaminado com óleo cru. Dissertação de Mestrado – EQ/UFRJ.

OLIVEIRA, F.J.S. & DE FRANÇA, F.P., 2005, “Increase in Removal of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons During Bioremediation of Crude Oil-Contaminated Sandy Soil”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121-24, p. 593-603.

OSTROUMOV, V. E. & SIEGERT, C. 1996. Exobiological aspects of mass transfer in microzones of permafrost deposits. *Advances in Space Research* 18(12), pp.79–86.

PALA, D.M. 2002. “Estudo da biorremediação de solo impactado por óleo cru”. Dissertação de Mestrado. COPPE/UFRJ. Rio de Janeiro. 114p.

PANDEFF, P. A., GUIMARAES, M. F., DONHA, A., SILVA, J. G. 2008. Avaliação de impactos sócio-ambientais da indústria petroquímica: o caso da COMPERJ e a APA-GUAPIMIRIM/RJ. *IV congresso nacional de excelência em gestão*. pp.1-22.

PELTOLA, R., SALONEN, M.S., PULKKINEN, J., KOIVUNEN, M., TURPEINEN, A.R., AARNIO, T., ROMANTSCHUK, M., 2006, “Nitrification in polluted soil fertilized with fast-and slow-releasing nitrogen: A case study at a refinery landfarming site”, *Environmental Pollution*, n. 143, pp. 247-253.

PICADO, A., NOGUEIRA, A., BAETA-HALL, L., MENDONÇA, E., DE FATIMA, M.R., DO CÉU, M.S., MARTINS, A., ANSELMO, A.M., 2001, “Landfarming in a PAH-contaminated soil”, *Journal Environmental Science Health*, v. 36, pp. 1579-1588.

PIOTROWSKA-SEGET, Z., MROZIK, A. 2009. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research* 165. pp.363-375.

PRITCHARD, P., COSTA, C. 1991. EPA's Alaska oil spill bioremediation project. *Environment Science and Technology*, v. 25, n. 3. pp. 372-379.

RAWE, J., KRIETEMEYER, S. & MEAGHER-HARTZELL, E. 1993. Guide for Conducting Treatability Studies under CERCLA: Biodegradation Remedy Selection—Interim Guidance. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. Siron, R., Pelletier, E. and Brochu, C. 1995. Environmental factors influencing the biodegradation of petroleum hydrocarbons in cold seawater. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28, pp. 406–416.

RIZZO, A. C. L., LEITE, S. G. F., SORIANO, A. U., SANTOS, R.L.C., SOBRAL, L. G. S.. Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores. CETEM, 2006.

RIZZO, A.C.L. . 2008. Desenvolvimento de Biorreator Não Convencional para o Tratamento de Solos Contaminados por Petróleo Tese de doutorado. EQ/UFRJ. Rio de Janeiro. 188p.

RÖLING, W. F. M. & VAN VERSEVELD, H. W. 2002. Natural attenuation: What does the subsurface have in store? *Biodegradation*. 13, pp.53–64.

SANTOS, R. M. (2007). Avaliação da adição do pó da casca de coco verde, como material estruturante, na biorremediação de solo contaminado por petróleo. *Tese de mestrado, EQ/UFRJ*, 144 p.

SAYLES, G.D., ACHESON, C.M., KUPFERLE, M.J., SHAN, Y., ZHOU, Q., MEIER, J.R., CHANG, L., BRENNER, R.C., 1999, "Land treatment of PAH-contaminated soil: performance measured by chemical and toxicity assays", *Environmental Science and Technology*, v. 33, pp. 4310-4317.

SCHWARZENBACH, R. P., GSCHWEND, P. M. & IMBODEN, D. M. 1993. Environmental Organic Chemistry. *Wiley Interscience*, New York.

SILVA, L.J. 2009. Processo de *Landfarming* para Tratamento de Resíduos Oleoso. Tese de M.Sc. em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

SPARROW, S. D. & SPARROW, E. B. 1988. Microbial biomass and activity in a subarctic soil ten years after crude oil spills. *J. Environ. Qual.* 17, pp.304–309.

SPENCE, M. J., BOTTRELL, S. H., Thornton, S. F., RICHNOW, H. H. & SPENCE, K. H. 2005. Hydrochemical and isotopic effects associated with petroleum fuel biodegradation pathways in a chalk aquifer. *J. Contam. Hydrol.* 79, pp. 67–88.

STEVEN, B., L'EVEILL'E, R., POLLARD, W. H. & WHYTE, L. G. 2006. Microbial ecology and biodiversity in permafrost. *Extremophiles.* 10(4), pp. 259–267.

SUTHERLAND, J. B. 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Volume 9, Number 1, 53-61.

THOMASSIN-LACROIX, E. J. M. 2000. Fate and effects of hydrocarbon-degrading bacterial used to inoculate soil for on-site bioremediation in the Arctic. *M.Sc. Thesis, Royal Military College of Canada.*

URURAHY, A. F. P. Biodegradação de Resíduo Oleoso Proveniente de Refinaria de Petróleo. (1998). *Tese DSc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 344p.*

USEPA - U. S. Environmental Protection Agency (2004), How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground storage tank Sites: A Guide for corrective Action Plan reviewers. (EPA 510-B-94-003, and EPA 510-R-02-002). Disponível em: <http://www.epa.gov/oust/pubs/tums.htm>. Pesquisado em : Outubro de 2011.

VIDALLI, M., 2001, “Bioremediation: an overview”, *Pure Applied Chemistry*. v. 73, pp. 1163–1172.

VASCONCELOS, U., OLIVEIRA, F. J. S, de FRANCA, F. P. 2011. Removal of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. *Quím. Nova*, v. 34-2, 218-221.

VOROBYOVA, E., SOINA, V., GORLENKO, M., MINKOVSKAYA, N., ZALINOVA, N., MAMUKELASHVILI, A., GILICHINSKY, D., RIVKINA, E. & VISHNIVETSKAYA, T. 1997. The deep cold biosphere: facts and hypothesis. *FEMS Microbiology. Review.* (20), pp. 277–290.

WALKER, V. K., PALMER, G. R. & VOORDOUW, G. 2006. Freeze-thaw tolerance and clues to the winter survival of a soil community. *Appl. Environ. Microb.* 72(3): pp. 1784–1792.

WOLIN, M. J. & MILLER, T. L. 1987: Bioconversion of organic carbon to CH₄ and CO₂. *Geomicrobiol.J.*, (5). pp. 239-260.